

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALLAN VINICIUS FELIX LOURENÇO

**DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Baccharis* L. DA SEÇÃO *Caulopterae* POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO ALIADA À QUIMIOMETRIA**

CURITIBA

2017

ALLAN VINICIUS FELIX LOURENÇO

**DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Baccharis* L. DA SEÇÃO *Caulopterae* POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO ALIADA À QUIMIOMETRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr^a Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2017

Lourenço, Allan Vinicius Felix

Discriminação de espécies de *Baccharis* L. da seção *Caulopterae* por espectroscopia de infravermelho aliada à quimiometria / Allan Vinicius Felix Lourenço – Curitiba, 2017.
99 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

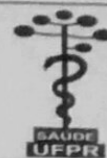
Orientadora Professora Dra. Francinete Ramos Campos

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais. 2. *Baccharis*. 3. Controle de qualidade. I. Campos, Francinete Ramos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321



TERMO DE APROVAÇÃO

ALLAN VINICIUS FELIX LOURENÇO

Título: "DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Baccharis* L. DA SEÇÃO *Caulopterae* POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO ALIADO A QUIMIOMETRIA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Profª. Dra. Francinete Ramos Campos
Orientadora

Profª. Dra. Jane Manfron Budel
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª. Dra. Noemi Nagata
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 22 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado a vida e sempre estar presente em todos os momentos da minha vida. A Ele dedico todos os méritos das minhas conquistas!

A minha orientadora **Professora Dra. Francinete Ramos Campos**, pela confiança, pela parceria e pela amizade. Com a sua orientação pude adquirir muito conhecimento técnico, também aprendi muito com o convívio, sempre muito alegre e leve. Obrigado Professora, saiba que pode sempre contar comigo tanto profissionalmente quanto pessoalmente, como grande amigo para vida.

Aos meus amigos do LABICEM **Anne Lore Moreira, Anne Góes, Estevan Bruginski, Jane Cristina Marques Lara, Letícia Meier, Paola de Paula e Tatiana Zuccoloto**, que durante o mestrado foram meus ombros amigos, fonte de motivação, onde tivemos momentos de alegria e de muita união. Agradeço a todos pela parceria e saiba que sempre estarei disponível para uma conversa amiga.

Quero agradecer aos meus amigos **Michel Salamanca Coelho e Cristiane Loiva Reichert**, que acompanharam minha jornada desde a graduação, e que sempre se dispuseram a me ajudar e apoiar em todas as áreas da minha vida.

A minha mãe **Terezinha de Jesus Félix**, a minha irmã **Melissa Félix Lourenço**, ao meu tio **Dácio Varela Félix** e as minhas tias **Anágela Cristina Morete Félix e Dulce Félix Lourenço**, que foram responsáveis pela formação do meu caráter, sempre sendo exemplos de pessoas corretas, e por ser o meu porto seguro, onde sempre desembarco para renovar minhas energias.

A minha namorada **Bruna Carolina Lui Dias**, por sempre estar ao meu lado, pelos ensinamentos, pela dedicação, e por dividir todos os momentos ao meu lado. Agradeço também ao amor que dividimos, pois este sempre me deu forças para seguir em frente.

Ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR**, pela oportunidade e pela minha formação profissional.

Muito Obrigado!

RESUMO

Baccharis possui cerca de 354 espécies distribuídas exclusivamente no continente americano. O gênero é classificado em 21 seções onde está presente a seção *Caulopterae*, constituída por espécies conhecidas como “carqueja”, utilizadas popularmente no tratamento de problemas gastrointestinais. Estas apresentam como principal característica a presença de caules alados, muito similares morfológicamente, sendo por isso coletadas indiscriminadamente. *Baccharis trimera* (Less.) DC. é a única presente na Farmacopeia Brasileira e na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Devido à dificuldade de identificação da espécie até mesmo por taxonomistas, ações para garantir a autenticação da mesma são necessárias. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método por espectroscopia de infravermelho associada a quimiometria para a discriminação entre amostras de *Baccharis trimera* de outras espécies da seção *Caulopterae*. Para isso, amostras de 36 *B. trimera*, 29 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., 11 *Baccharis junciformis* DC., 14 *Baccharis milleflora* (Less.) DC., e 16 *Baccharis myriocephala* DC. foram pulverizadas para a obtenção dos espectros de infravermelhos médio (MIR) e próximo (NIR). Inicialmente, Análises de Componentes Principais (PCA) utilizando os espectros nas regiões MIR e NIR de todas as amostras foram realizadas para avaliar a possível discriminação entre as espécies (gráfico de *scores*) e as variáveis responsáveis pelas discriminações (gráfico de *loadings*). Posteriormente, foram construídos modelos utilizando Análises Discriminantes por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para classificação das amostras de *Baccharis*. Para isso 74% das amostras (conjunto de calibração) foram utilizadas para a construção do modelo, e cerca de 26% para a validação externa. Na PCA das amostras houve discriminação entre as espécies separadamente e simultaneamente, entretanto quando analisado as amostras de *B. trimera* e *B. myriocephala* houve apenas uma separação parcial. Os modelos de classificação (PLS-DA) foram eficientes na predição das amostras de *Baccharis* durante a validação externa, destacando os que foram utilizados a região NIR, que apresentou 100% de acertos. Entretanto, quando aplicado para amostras de *B. myriocephala*, somente uma amostra foi classificada como falso-positiva. Os modelos validados foram aplicados na análise de 36 amostras comerciais, que foram classificadas na sua maioria como *B. myriocephala*, espécie não recomendada pela farmacopeia brasileira. Em suma, o método desenvolvido por espectroscopia de infravermelho próximo demonstrou-se eficiente na discriminação e na classificação de amostras de *Baccharis*. Por ser uma técnica rápida, com mínimo preparo de amostra e reprodutível, pode ser utilizada na rotina do controle de qualidade de *B. trimera*, promovendo assim uma maior segurança para o paciente na utilização dessa planta.

Palavras-chave: *Baccharis trimera*. Espectroscopia de infravermelho. Quimiometria. PCA. PLS-DA.

ABSTRACT

Baccharis has about 354 species distributed exclusively in the American continent. The genus is classified into 21 sections where *Caulopterae* section is present, species in this section are known as "carqueja", popularly used in the treatment of gastrointestinal diseases. These have as main characteristic the presence of winged stems, very similar morphologically, being collected indiscriminately. *Baccharis trimera* (Less.) DC. is the only one present in the Brazilian Pharmacopoeia and in the National Relation of Medicinal Plants of Interest to SUS (RENISUS). Due to the difficulty of identifying these species even by taxonomists, actions to ensure authentication is required. In this sense, the present work had as objective the development of a method by infrared spectroscopy associated to chemometrics for the discrimination between samples of *Baccharis trimera* and of others species of the section. For this, samples of 36 *B. trimera*, 29 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., 11 *Baccharis junciformis* DC., 14 *Baccharis milleflora* (Less.) DC., and 16 *Baccharis myriocephala* DC. were sprayed to obtain the medium (MIR) and near (NIR) infrared spectra. Initially Principal Component Analysis (PCA) using the spectra in the MIR and NIR regions of all samples was performed to evaluate possible species discrimination (scores plot) and the variables responsible for the discriminations (loadings plot). Subsequently, models were constructed using Discriminant Analysis by Partial Least Squares (PLS-DA) to classify the *Baccharis* samples. For this, 74% of the samples (calibration set) were used for the construction of the model, and about 26% for the external validation. In the PCA of the samples there was discrimination between the species separately and simultaneously, however, only partial a separation was obtained between *B. trimera* and *B. myriocephala* samples. The classification models (PLS-DA) were efficient in predicting the *Baccharis* samples during the external validation, highlighting those that were used in the NIR region, which presented 100% correct answers. However, when applied to *B. myriocephala* samples, only one sample was classified as false-positive. The validated models were applied in the analysis of 36 commercial samples, which were classified in the majority as *B. myriocephala*, species not recommended by the Brazilian pharmacopoeia. In short, the method developed by near-infrared spectroscopy proved to be efficient in discriminating and classifying *Baccharis* samples. Because, it is a fast technique with minimal sample preparation and reproducible, it can be used in the quality control routine of *B. trimera*, thus promoting greater safety for the patient in the use of this plant.

Keywords: *Baccharis trimera*. Infrared Spectroscopy. Chemometrics. PCA. PLS-DA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>Baccharis</i>	20
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i> DA SEÇÃO <i>Caulopterae</i>	21
FIGURA 3 – ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. myriocephala</i> E <i>B. milleflora</i>	23
FIGURA 4 – TIPOS DE VIBRAÇÕES MOLECULARES NO INFRAVERMELHO	24
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO HARMÔNICO (A) E ANARMÔNICO B).....	25
FIGURA 6 - MECANISMO DE ANÁLISE POR INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA DIFUSA.....	27
FIGURA 7 – MÓDULO DRIFT PARA ANÁLISE POR REFLETÂNCIA DIFUSA	28
FIGURA 8 – ESPECTROFOTÔMETRO DE INFRAVERMELHO BASEADO EM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR), MODELO VERTEX 70, EMPRESA BRUKER.....	38
FIGURA 9 – MÓDULO DRIFT EMPRESA PIKE	38
FIGURA 10 – ESPECTRO DE MIR DE UMA AMOSTRA DE <i>Baccharis</i> SEM DILUIÇÃO EM KBr.....	41
FIGURA 11 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO MÉDIO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE AMOSTRA E KBR: A (1:100); B (1:20); C (1:5); D (1:2).....	42
FIGURA 12 – ESPECTRO DE NIR DE UMA AMOSTRA DE <i>Baccharis</i> SEM DILUIÇÃO EM KBr.....	43
FIGURA 13 – ESPECTROS DE MIR DAS AMOSTRAS DE <i>Baccharis</i> COM KBr	44
FIGURA 14 – ESPECTROS DE NIR DAS AMOSTRAS DE <i>Baccharis</i> SEM KBR....	45
FIGURA 15 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articulata</i> NA REGIÃO MIR.....	47
FIGURA 16 – GRÁFICO DE SCORES DE PC3 <i>VERSUS</i> PC4 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articula</i> NA REGIÃO MIR.....	48

FIGURA 17 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> e <i>B. articulata</i> NA REGIÃO MIR.....	49
FIGURA 18 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS 3,5-DI-O-CAFFEOIL-ÁCIDO QUINÍCO E ÁCIDO CAFEICO IDENTIFICADOS NA ESPÉCIE DE <i>B. trimera</i>	50
FIGURA 19 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS 5,7-DIHIDROXI-4'-METOXIFLAVONA E 5-HIDROXI-4',7-DIMETOXIFLAVONA IDENTIFICADOS NA ESPÉCIE DE <i>B. articulata</i>	50
FIGURA 20 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NA REGIÃO MIR	51
FIGURA 21 – GRÁFICO DE <i>SCORES</i> DE PC2 <i>VERSUS</i> PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NA REGIÃO MIR.....	52
FIGURA 22 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NA REGIÃO MIR.....	53
FIGURA 23 – ESTRUTURA DO COMPOSTO 5-O-CAFFEOIL-ÁCIDO QUINÍCO IDENTIFICADO NAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> E DO COMPOSTO 3-O-CAFFEOIL-ÁCIDO QUINÍCO IDENTIFICADO NA ESPÉCIE DE <i>B. trimera</i>	54
FIGURA 24 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NA REGIÃO MIR	55
FIGURA 25 - GRÁFICO DE <i>SCORES</i> DE PC2 <i>VERSUS</i> PC4 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NA REGIÃO MIR.....	56
FIGURA 26 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC2 <i>VERSUS</i> PC4 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NA REGIÃO MIR	57
FIGURA 27 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO	

NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO MIR	58
FIGURA 28 – GRÁFICO DE SCORES DE PC2 VERSUS PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO MIR	59
FIGURA 29 – GRÁFICO DE AUTOVALORES VERSUS NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO MIR.....	60
FIGURA 30 – GRÁFICO DE SCORES DE PC3 VERSUS PC4 VERSUS PC5 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO MIR	61
FIGURA 31 – GRÁFICO DE LOADINGS DE PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO MIR	63
FIGURA 32 – GRÁFICO DE AUTOVALORES VERSUS NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articulata</i> NA REGIÃO NIR	64
FIGURA 33 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC2 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articula</i> NA REGIÃO NIR.....	65
FIGURA 34 – GRÁFICO DE LOADINGS DE PC1 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articulata</i> NA REGIÃO NIR.....	66
FIGURA 35 – GRÁFICO DE AUTOVALORES VERSUS NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NA REGIÃO NIR.....	67
FIGURA 36 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC5 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NA REGIÃO NIR	68

FIGURA 37 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC1 <i>VERSUS</i> PC5 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NA REGIÃO NIR.....	69
FIGURA 38 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NA REGIÃO NIR	70
FIGURA 39 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 <i>VERSUS</i> PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NA REGIÃO NIR	71
FIGURA 40 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC1 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NA REGIÃO NIR	71
FIGURA 41 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO NIR	72
FIGURA 42 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 <i>VERSUS</i> PC2 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO NIR	73
FIGURA 43 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC2 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO NIR	74
FIGURA 44 – GRÁFICO DE AUTOVALORES <i>VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO NIR	75
FIGURA 45 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 <i>VERSUS</i> PC2 <i>VERSUS</i> PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articula</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO NIR	76
FIGURA 46 – GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC1, PC2 E PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NA REGIÃO NIR	77

FIGURA 47 – GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE LV NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO MIR	79
FIGURA 48 – GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> <i>VERSUS</i> RESÍDUOS DE <i>STUDENTS</i> UTILIZADO PARA VERIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO MIR	80
FIGURA 49 - GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE LV NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> SEM A AMOSTRA 53 NA REGIÃO MIR	81
FIGURA 50 – GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO MODELO PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO MIR	82
FIGURA 51 – GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE LV NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO NIR.....	83
FIGURA 52 – GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> <i>VERSUS</i> RESÍDUOS DE <i>STUDENTS</i> UTILIZADO PARA VERIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO NIR.....	84
FIGURA 53 – GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO MODELO PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO NIR	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i> COLETADAS, QUANTIDADE DE EXEMPLARES, PERÍODO DA COLETA E LOCALIZAÇÃO DA COLETA.....	36
TABELA 2 – RELAÇÃO PESO/PESO (mg) DE AMOSTRA EM PÓ DE <i>Baccharis</i> e KBr	37
TABELA 3 – AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DO MODELO PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO MIR.....	82
TABELA 4 – AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DO MODELO PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO NIR	85
TABELA 5 – AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i>	86
TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COMERCIAIS PELOS MODELOS DE PLS-DA NA REGIÃO NIR CONSTRUÍDOS PARA AMOSTRAS DE <i>Baccharis</i>	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DRIFT	- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa.
GC	- Cromatografia à gás
H	- Hidrogênio
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
IV	- Infravermelho
KBr	- Brometo de potássio
L	- <i>Leverage</i>
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MIR	- Infravermelho médio
<i>p/p</i>	- Peso/peso
MSC	- Correção do espalhamento multiplicativo
NIR	- Infravermelho próximo
PC	- Componente principal
PC1	- Primeira componente principal
PC2	- Segunda componente principal
PC3	- Terceira componente principal
PC4	- Quarta componente principal
PCA	- Análise de Componentes Principais
PLS	- Regressão de mínimos quadrados parciais
PLS-DA	- Análise Discriminante por mínimos quadrados parciais
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMSEC	- Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração
RMSECV	- Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada
RMSEP	- Raiz quadrada do erro médio quadrático de predição
RENISUS	- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SNV	- Padronização normal de sinal
SUS	- Sistema Único de Saúde
UV	- Ultravioleta
LV	- Variáveis latentes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Baccharis</i> L.....	20
3.2 SEÇÃO <i>Caulopterae</i>	21
3.3 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO	23
3.3.1 REFLECTÂNCIA DIFUSA – DRIFT	26
3.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	28
3.4.1 PRÉ-PROCESSAMENTO.....	30
3.4.2 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS	31
3.4.3 ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS	32
3.4.4 USO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	36
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	36
4.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	37
4.4 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.....	38
4.4.1 Análise de Componentes Principais – PCA	39
4.4.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA..	39
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	41

5.1 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE POR INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) E PRÓXIMO (NIR)	41
5.2 AVALIAÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO	43
5.3 ANÁLISE POR COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DOS ESPECTROS MIR E NIR.....	45
5.3.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articulata</i> NO MIR	46
5.3.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NO MIR.....	50
5.3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NO MIR.....	54
5.3.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NO MIR.....	57
5.3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> e <i>B. myriocephala</i> NO MIR	60
5.3.6 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. articulata</i> NO NIR.....	63
5.3.7 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. junciformis</i> NO NIR	66
5.3.8 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. milleflora</i> NO NIR	69
5.3.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> E <i>B. myriocephala</i> NO NIR	72
5.3.10 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES <i>B. trimera</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> , <i>B. milleflora</i> E <i>B. myriocephala</i> NO NIR.	74
5.4 ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA POR MINIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA).....	77

5.4.1	MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> NA REGIÃO MIR	78
5.4.2	MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> REGIÃO NIR.....	83
5.4.3	MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE <i>Baccharis articulata</i> , <i>Baccharis junciformis</i> , <i>Baccharis milleflora</i> E <i>Baccharis myriocephala</i>	86
5.5	APLICAÇÃO DOS MODELOS POR PLS-DA EM AMOSTRAS COMERCIAIS	87
6.	CONCLUSÕES.....	90
7.	REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, houve um aumento expressivo no uso de plantas medicinais para tratamentos de enfermidades, representando grande importância na medicina contemporânea. (ROSA et al., 2011). Cerca de 80% da população de países em desenvolvimento, especialmente países da Ásia, África, América Latina e Oriente Médio, recorrem à medicina popular para cuidados primários de saúde. (WHO, 2011). Esse aumento também se reflete em países desenvolvidos, especialmente em países como Canadá, França, Alemanha e Itália, em que 70% a 90% da população fazem uso de medicamentos fitoterápicos como tratamentos complementares ou alternativos. (WHO, 2011).

Além da importância terapêutica e uso, as plantas medicinais demonstram uma contribuição significativa na economia mundial. O setor de fitoterápicos movimentou no ano de 2000 cerca de US\$ 19,6 bilhões, chegando em 2007 a US\$ 21,7 bilhões. (MINISTERIO DA SAÚDE, 2001; CARVALHO et al., 2008).

Na economia brasileira o mercado fitoterápico movimentou R\$ 1,1 bilhão em 2011, representando um aumento de 13% em relação à receita do ano anterior, este aumento demonstra o acompanhamento das indústrias nacionais com o crescimento mundial no setor. (ALVES, 2013).

Com o aumento da aceitação popular em relação ao uso de fitoterápicos e levando em consideração a biodiversidade brasileira, ações governamentais vêm sendo tomadas para a regulamentação do setor fitoterápico nacional. Uma dessas ações foi a aprovação pelo governo federal do decreto de N° 5.813, de 22 de junho de 2006, que visa ações para garantir a segurança e o uso racional de plantas medicinais. Dentre as diretrizes presentes no decreto vale ressaltar as que visam principalmente à regulamentação do cultivo de plantas medicinais, incentivo a capacitação de recursos humanos, incentivo as pesquisas e ao desenvolvimento tecnológico, que formam pilares fundamentais para assegurar a qualidade dos fitoterápicos e garantir a segurança ao paciente. (BRASIL, 2006).

No mesmo sentido, inúmeras resoluções foram criadas desde então, de modo a regulamentar o setor de fitoterápicos. A resolução mais recente é a RDC 26 de 2014, que define medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos. Ainda estabelece os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de

medicamento fitoterápico e também o registro, renovação de registro e notificação para produto tradicional fitoterápico. A resolução define medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos como aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas. (BRASIL, 2014).

A RDC 26 de 2014 apresenta como principais novidades a necessidade de testes clínicos e de eficácia para medicamentos fitoterápicos, além da inclusão de análises de resíduos de agrotóxicos, ocratoxinas, fumonisinas e tricotecenos ao controle de qualidade dos fitoterápicos. (BRASIL, 2014).

Além da regulamentação dos fitoterápicos, o Ministério da Saúde já em 2009 elaborou a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), composta por 71 espécies com potencial terapêutico. O objetivo desta ação visa orientar pesquisas científicas que possam auxiliar na elaboração de novos fitoterápicos que possam ser utilizados como ferramentas terapêuticas pela população. (BRASIL, 2009).

Dentre as espécies listadas no RENISUS está presente *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). Esta é popularmente conhecida como carqueja e está descrita na 5ª Edição da Farmacopéia Brasileira, sendo uma das drogas vegetais mais consumidas no Brasil. (CORREIA-JUNIOR; MING; SCHEFFER, 1991; PANIS, 2008).

Muitas espécies de *Baccharis* L. apresentam caules alados e constam na seção *Caulopterae*, assim como *Baccharis trimera*, e são facilmente confundidas entre si, como por exemplo, *Baccharis junciformis* DC., *Baccharis milleflora* DC., *Baccharis myriocephala* DC., e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (HEIDEN et al., 2009). Nesse sentido, análises de controle de qualidade são fundamentais para garantir a autenticidade da droga vegetal.

A dificuldade de identificação e o uso indiscriminado pela população aliadas ao fácil acesso dessas drogas vegetais, apresentam um potencial risco à saúde da população. Deste modo diversas ferramentas analíticas vêm contribuindo para a autenticação de drogas vegetais, como por exemplo, cromatografia a líquido de alta eficiência, cromatografia a gás, espectrometria de massas, espectroscopia por ressonância magnética nuclear, espectroscopia por Ultravioleta, espectroscopia por infravermelho entre outras.

Nesse contexto, este projeto visa o desenvolvimento e validação de um método analítico por Espectroscopia de Infravermelho Médio e Próximo aliado a

quimiometria para discriminação de espécies de *Baccharis*, contribuindo para o controle de qualidade de *B. trimera*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método de análise por Espectroscopia de Infravermelho aliado à quimiometria para a discriminação e classificação de *Baccharis trimera* (Caulopterae).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

I – Coletar as partes aéreas floridas de espécies de *Baccharis trimera*, *Bacharis articulata*, *Baccharis junciformis*, *Baccharis milleflora* e *Baccharis myriocephala*.

II – Otimizar o preparo das amostras para análise por espectroscopia de infravermelho;

III – Adquirir os espectros de infravermelho na região MIR e NIR a partir das amostras pulverizadas;

IV – Realizar análise exploratória por PCA dos espectros obtidos por infravermelho para verificar a possível discriminação entre as espécies;

V – Construir modelos de classificação por PLS-DA com os espectros de infravermelho adquiridos;

VI – Aplicar o método analítico em amostras comerciais de carquejas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Baccharis* L.

Baccharis possui cerca de 354 espécies, sendo o maior representante da família Asteraceae. (MULLER, 2013). As espécies são encontradas exclusivamente no continente americano, desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina e Chile (GIULIANO, 2001), sendo que 90% das espécies estão presentes na América do Sul. (MULLER, 2013).

No Brasil são encontradas cerca de 175 espécies (HEIDEN; SCHNEIDER, 2013), localizadas principalmente na região Sudeste e Sul, onde a grande diversidade está localizada principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. (HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Baccharis*



FONTE: TROPICOS (2015).

Cerca de 20% das espécies de *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para prevenção ou tratamento de doenças. Os principais usos incluem tratamento de doenças gastrointestinais, úlceras, reumatismo, febre e diabetes (ABAD; BERMEJO, 2007).

Aproximadamente 100 espécies de *Baccharis* já foram estudadas quimicamente (ARGOTI et al., 2013), sendo óleos essenciais e metabólitos secundários como flavonoides e terpenoides os principais identificados (KARAM et al., 2013). Estudos biológicos realizados com extratos e compostos isolados

demonstraram atividades tais como: antimicrobiana, antioxidante, gastroprotetora, antidiabética, anti-inflamatória entre outras. (VERDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2016).

Por apresentar grande diversidade de atividades biológicas e uso indiscriminado pela população, grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas vêm apresentando grande interesse por essas espécies.

3.2 SEÇÃO *Caulopterae*

As espécies do gênero *Baccharis* são divididas em 21 seções, entre estas está presente *Caulopterae*, constituída por 32 espécies distribuídas na América do Sul (Figura 2). (SCHNEIDER, 2009). O Brasil apresenta cerca de 23 espécies da seção com ocorrência principalmente na região Sudeste e Sul do país, destacando o estado do Rio Grande do Sul em que já foram relatadas 22 espécies. (HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009). Essas espécies são localizadas em ambientes campestres e em bordas de florestas, podendo ser encontradas ao nível do mar e em altitudes de até 2500 metros. (SCHNEIDER, 2009).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE *Baccharis* DA SEÇÃO *Caulopterae*



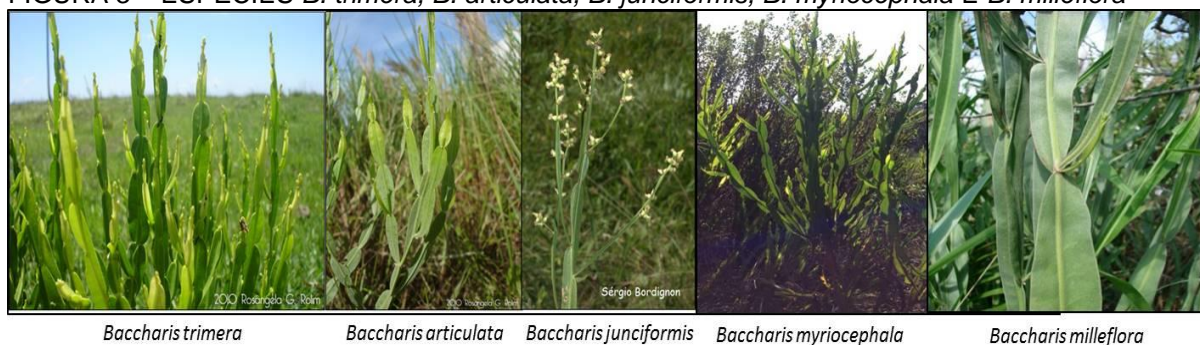
FONTE: Adaptado de HEIDEN (2005).

A maioria das espécies da seção *Caulopterae* apresenta como característica a presença de caules alados ou cladódios, podendo as folhas estar ausentes ou em quantidade reduzida. A presença de caules alados nessas espécies causa grande dificuldade na identificação botânica. Estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada por Schneider (2009) demonstrou que algumas espécies da seção apresentam similaridade até mesmo em microestruturas.

As espécies da seção apresentam grande importância econômica, sendo utilizadas na apicultura, no paisagismo e na medicina popular. (HEIDEN et al., 2006). Na medicina popular são conhecidas como “carquejas” e são utilizadas para diversos tratamentos, porém o principal uso é no tratamento de distúrbios gastrointestinais. (BUDEL et al.; 2005).

Baccharis trimera (Less.) DC. é a espécie mais utilizada popularmente, conhecida como “carqueja” ou “carqueja-amarga”, seu principal uso é principalmente como digestiva, diurética, hepatoprotetora e para emagrecimento. (PERON et al., 2008; KARAM et al., 2013; CONDE et al, 2015). Em virtude do uso popular bem estabelecido por muitos anos, *B. trimera* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e está presente na Farmacopeia Brasileira. (BRASIL 2009).

Muitas espécies são comumente confundidas com *B. trimera*, como por exemplo, *B. articulata* (Lam.) Pers. conhecida como “carquejinha-doce” (OLIVEIRA et al., 2003; SCHNEIDER, 2009), *Baccharis milleflora* (Less.) DC “carqueja-do-lajeado” (HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009; BESTEN, et al., 2014), *Baccharis junciformis* DC. “carqueja-do-banhado” (Figura 3) (HEIDEN; BAUMGRATZ; ESTEVES, 2012), *Baccharis. myriocephala* DC., entre outras. (HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009). A grande similaridade morfológica leva ao uso equivocado pela população de espécies confundidas com *B. trimera*, podendo gerar risco de toxicidade, além de não garantir a eficiência terapêutica. (BUDEL et al., 2005).

FIGURA 3 – ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. myriocephala* E *B. milleflora*

FONTE: (ROLIN, 2010; BORDIGNON, 2015).

Nesse sentido, muitos estudos já foram realizados para diferenciação das espécies. Os principais trabalhos são de caracterização morfoanatômica, de modo a fornecer subsídios para a correta identificação das espécies, fornecendo maiores informações, porém em nível somente botânico. (BUDEL; DUARTE, 2009; HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009). Estudos químicos, principalmente a análise de perfil químico e identificação de compostos, vêm agregando de modo a esclarecer a composição química entre as espécies da seção *Caulopterae*. Este tipo de pesquisa ainda é escasso, pois muitas espécies não apresentam estudos, como por exemplo, *B. milleflora* que possui apenas estudos de óleos essenciais. (CAMPOS et al., 2016). Assim as espécies da seção *Caulopterae* apresentam um campo amplo de pesquisa, que por apresentarem grande importância econômica e social devem ser mais desbravadas no campo científico.

3.3 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO

A radiação infravermelha é uma faixa da radiação eletromagnética que compreende a região de 13000 a 10 cm^{-1} . O infravermelho é dividido em três regiões, o infravermelho próximo (NIR) abrangendo a faixa de 13000 a 4000 cm^{-1} , o infravermelho médio (MIR) com faixa de 4000 a 200 cm^{-1} , e o infravermelho distante (FIR) na faixa de 200 a 10 cm^{-1} . (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

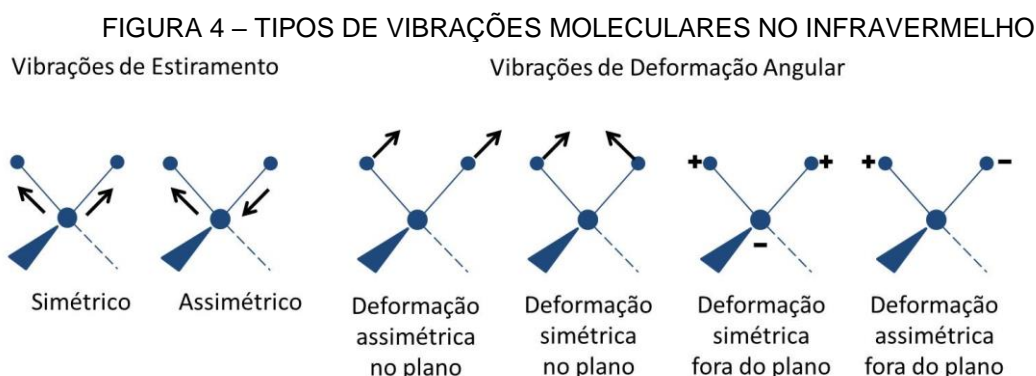
A radiação infravermelha não apresenta energia suficiente para realização de transições eletrônica. Entretanto, sua radiação provoca vibrações e torções moleculares. Para que ocorra a absorção por infravermelho é necessário que a frequência da vibração molecular seja igual à da radiação infravermelha e que a

molécula apresente um momento dipolo em suas ligações. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

O momento dipolo é gerado pela diferença de carga e pela distância da ligação entre dois átomos. Por esse motivo moléculas como, por exemplo, o gás oxigênio que são homonucleares não absorvem radiação no infravermelho, pois apresentam momento dipolo igual à zero. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

As moléculas em temperatura ambiente se encontram em estado vibracional fundamental, porém ao absorver a radiação no infravermelho passam a ficar no estado vibracional excitado. A diferença de energia entre o estado vibracional fundamental e o estado excitado corresponde à radiação no infravermelho médio, enquanto que a diferença entre o estado fundamental e o segundo estado vibracional excitado corresponde ao infravermelho próximo. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Com a excitação vibracional ocorre uma variação na amplitude da vibração molecular. Essas vibrações são classificadas em estiramentos e deformações angulares (Figura 4). No estiramento ocorre um movimento ao longo do eixo da ligação gerando aumento e diminuição da distância interatômica, esse tipo de variação pode ser classificado em estiramento simétrico e assimétrico. Na deformação angular ocorre variação do ângulo entre duas ligações, existindo quatro tipos de vibrações: deformação angular simétrica no plano (balanço) e fora do plano (sacudida), e deformação angular assimétrica no plano (tesoura) e fora do plano (torção). (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).



FONTE: Adaptado de BERGO (2014).

A vibração de moléculas diatômicas pode ser descrita através do modelo oscilador harmônico. O modelo é fundamentado através da mecânica clássica, em

que considera dois átomos ligados a uma mola. Através desse modelo é possível calcular a energia potencial dessa ligação através da equação abaixo. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

$$E = \frac{1}{2} kx^2 = hv$$

Onde

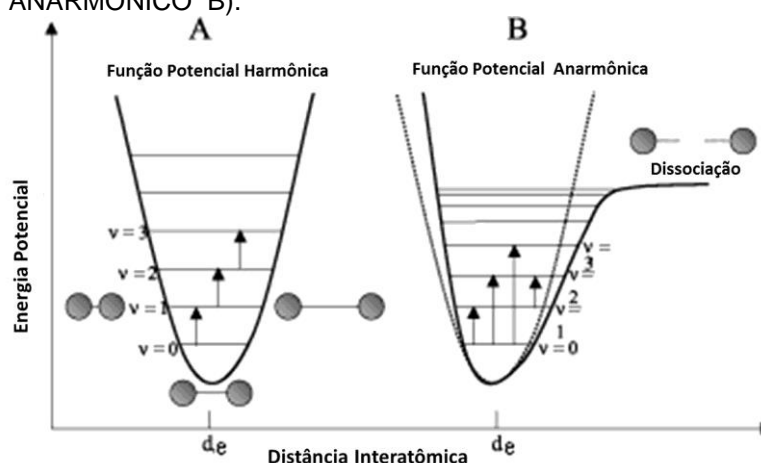
E - é a energia potencial da ligação

k - é a constante de força

x - o deslocamento da mola.

A energia potencial pela distância interatômica através do modelo do oscilador harmônico é representada na Figura 5-A, em que há formação de uma parábola de acordo com o aumento da distância interatômica (d_e). Importante destacar que quando a mola se encontra comprimida ou esticada, a energia potencial é máxima. Nesse sentido, quando a mola se encontra em posição de equilíbrio ou repouso o valor de energia potencial é mínimo. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO HARMÔNICO (A) E ANARMÔNICO B).



FONTE: Adaptado de PASQUINI, 2003.

Através do oscilador harmônico é possível determinar a frequência vibracional de moléculas diatômicas, de acordo com a equação (1).

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (1)$$

Onde:

ν - é a frequência vibracional

k - é a constante de força

μ - é dada pela equação (2)

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

Onde:

m_1 é a massa de um dos átomos na ligação

m_2 é a massa do átomo ligado ao primeiro

Apesar do modelo oscilador harmônico conseguir explicar moléculas simples, este não consegue descrever moléculas mais complexas, pois não considera a repulsão coulombica entre os átomos ou a dissociação das ligações, além de permitir somente transições energéticas iguais à $\Delta\nu = \pm 1$. (BLANCO; VILLARROYA, 2002).

Diante dessa dificuldade outro modelo foi descrito para melhor representação do comportamento de moléculas complexas, este denominado oscilador anarmônico, que está fundamentado na mecânica quântica. Nesse modelo é possível explicar transições $\Delta\nu = \pm 2$ ou superiores, e demonstrando uma diminuição na diferença de energia potencial quando há aumento dos níveis quânticos (Figura 4-B). Assim esse tipo de modelo consegue fundamentar teoricamente o surgimento de sobretoms e combinações de bandas, que estão presentes no infravermelho próximo. (PASQUINI, 2003).

3.3.1 REFLECTÂNCIA DIFUSA – DRIFT

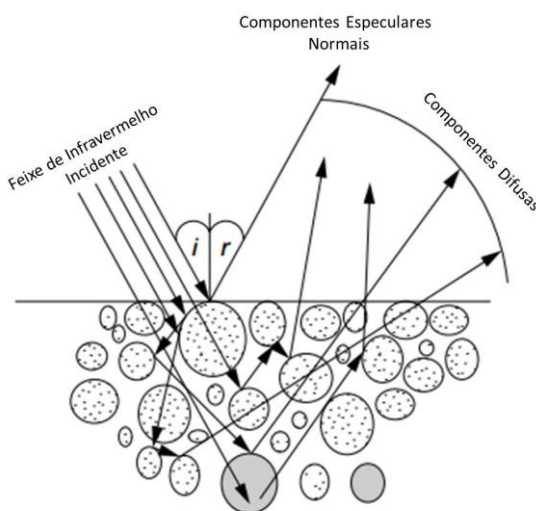
A análise por espectroscopia de infravermelha pode ser realizada por diversas técnicas, como por exemplo, transmissão, absorção e reflexão. Porém para análises de amostras sólidas, as técnicas por reflexão são preferencialmente utilizadas, principalmente em amostras que apresentam dificuldade na manipulação

tais como: fibras, alimentos, produtos agrícolas entre outras. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

A reflexão da radiação pode ser dividida em reflexão especular, reflexão interna, reflexão total atenuada e reflexão difusa. Dentre esses tipos, a reflexão difusa é o princípio da técnica por DRIFT (Transformada de Fourier Infravermelho por Reflectância Difusa). A análise por reflectância difusa é amplamente utilizada em espectrofotômetro de infravermelho, principalmente pela eficiência na aquisição de espectros em amostras sólidas pulverizadas, necessitando um mínimo preparo de amostra e permitindo a obtenção de informações sem alteração da amostra original. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Quando a radiação incide sobre a superfície da amostra, a radiação pode ser absorvida, refletida diretamente, refletida internamente ou difundida em todas as direções (Figura 6). Esta última é a radiação que é detectada nas análises de infravermelho por DRIFT.

FIGURA 6 - MECANISMO DE ANÁLISE POR INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA DIFUSA



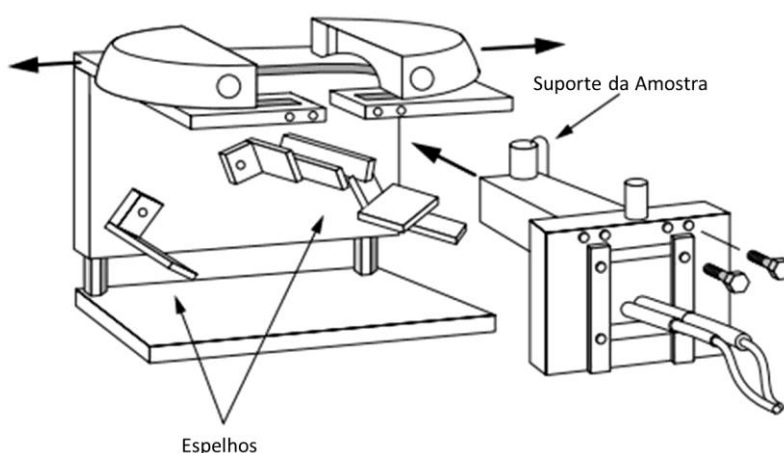
FONTE: Modificado de ARMAROLI (2004).

Na reflexão difusa o feixe da radiação infravermelha penetra em uma ou mais partículas, se difundindo através da amostra. Essa radiação é refletida contendo a informação sobre as propriedades da amostra, porém essa reflexão não possui um ângulo definido, assim é necessário um espelho elipsoidal para coletar a radiação e encaminhar ao detector. (ARMAROLI; BÉCUE; GAUTIER, 2004; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

A técnica por DRIFT oferece muitas vantagens como mínimo preparo das amostras, capacidade de analisar amostras não transparentes, com superfícies irregulares e com revestimento polimérico, entre outras. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

O módulo DRIFT de infravermelho é constituído por um suporte de amostra e inúmeros espelhos que refletem os feixes de radiação da amostra até o detector (Figura 7).

FIGURA 7 – MÓDULO DRIFT PARA ANÁLISE POR REFLETÂNCIA DIFUSA



FONTE: Modificado de ARMAROLI (2004).

Quando comparada com a análise por transmissão, a análise por DRIFT reproduz as mesmas informações espectrais, apresentando mesmo número de bandas, intensidades relativas e posição de picos das obtidas por transmissão. Entretanto, análises por DRIFT apresentam vantagens em relação ao preparo de amostra, além de sofrer menos com interferências causadas pela umidade contida na amostra. (ARMAROLI; BÉCUE; GAUTIER, 2004).

3.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

O termo quimiometria surgiu no ano de 1971 com o professor Svante Wold da Universidade de Umea na Suécia. Entretanto, a quimiometria somente alcançou seu auge no século 21, principalmente com o avanço tecnológico que possibilitou o desenvolvimento de softwares mais avançados, surgimento de ferramentas analíticas modernas e a hifenização dessas ferramentas. (KUMAR et al., 2014).

Com o desenvolvimento de equipamentos modernos e com a hifenização das ferramentas analíticas, os dados químicos obtidos tornaram-se mais complexos, podendo através de uma única análise se obter grande quantidade de informação. Por essa complexidade de dados, fez necessário a utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas para a extração mais eficiente das informações dos dados multivariados, surgindo então a quimiometria como a principal ferramenta para este fim. (ROHMAN et al, 2014; FERREIRA, 2015).

A quimiometria é uma área da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para extração de dados químicos que apresentam grande quantidade de variáveis, como por exemplo, cromatogramas e espectros. As ferramentas quimiométricas podem ser utilizadas para diversos fins como otimização de experimentos, pré-processamento de dados, calibração multivariada e reconhecimento de padrões. (ROHMAN et al, 2014).

O reconhecimento de padrões é um método quimiométrico que utiliza dados químicos para encontrar similaridades e diferenças entre amostras. Esses métodos são divididos em métodos não supervisionados e métodos supervisionados. (FERREIRA, 2015).

Métodos não supervisionados tem o intuito de obter a similaridade e a diferença entre as amostras utilizando somente informações dos dados obtidos por uma determinada técnica analítica, ou seja, sem construção de uma regra preditiva. Exemplos desse tipo de métodos são: Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamentos por Métodos Hierárquicos (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*). (FERREIRA, 2015).

Métodos supervisionados buscam a similaridade e a diferença entre as amostras, porém para isto utilizam informações pré-estabelecidas das classes das mesmas. Esse tipo de análise possibilita tanto reconhecimento de padrões quanto a construção de modelos de classificação. O método supervisionado mais utilizado na quimiometria é a Análise Discriminante pelos Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*, PLS-DA). (ERIKSSON; TRYGG; WOLD, 2016).

3.4.1 PRÉ-PROCESSAMENTO

O pré-processamento de dados é uma etapa preliminar a aplicação dos métodos quimiométricos. Esse procedimento visa diminuir ruídos, ajustar linha de base, reduzir variações sistemáticas ou aleatórias. O pré-processamento deve ser escolhido com critério, pois esta etapa pode comprometer os resultados das análises quimiométricas. (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015).

Existem vários tipos de pré-processamentos, porém os mais utilizados são: dados centrados na média, autoescalamento, correção do espalhamento multiplicativo (MSC), padronização normal de sinal (SNV), alisamento (Savitzki-Golay) e *detrend* (“eliminação de tendência”). (RINNAN et al., 2009).

Nos dados centrados na média calcula-se o valor médio de cada coluna da matriz de dados, sendo esse valor subtraído das respectivas colunas, tornando as coordenadas dos dados mais centralizadas. (FERREIRA, 2015).

O autoescalamento subtrai de cada elemento de uma coluna da matriz de dados o valor médio da respectiva coluna e divide o resultado pelo desvio padrão dessa coluna. (FERREIRA, 2015).

A correção do espalhamento multiplicativo (MSC) tem como objetivo a correção do espalhamento aditivo e multiplicativo na absorbância. Esses efeitos são dependentes do comprimento de onda e devem ser removidos, pois constituem fontes de variabilidade irrelevante para o problema. (FERREIRA, 2015).

A transformação padrão normal de variação (SNV) corrige efeitos aditivos e multiplicativos e é apropriado para remover interferências de espalhamentos e de tamanho de partícula sólida. (FERREIRA, 2015).

No alisamento Savitzki-Golay, usa-se uma média ponderada em que os pesos são obtidos por um ajuste polinomial. O objetivo da técnica é a diminuição dos ruídos aumentando a relação sinal/ruído. (FERREIRA, 2015).

Detrend é aplicado sobre os espectros para remover os efeitos de linha de base e curvilinearidade. Este efeito é geralmente linear, mas para amostras densamente empacotadas, torna-se curvilínea. O método consiste em modelar a linha de base como uma função dos comprimentos de onda com um polinomial de segundo grau, e esta função é, então, subtraída do espectro de cada um de forma independente, obtendo-se o espectro correto. (ARAZURI et al., 2014).

3.4.2 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (PCA) é um método de reconhecimento de padrões não supervisionados, introduzida por Karl Person em 1901. O objetivo da PCA é a redução da dimensão dos conjuntos de dados de modo a facilitar a interpretação dos mesmos sem perder informações relevantes. (YANG et al., 2014; GHASEMI et al., 2014; RERIS et al., 2015).

Na PCA os dados são organizados em matriz, formada por linhas que correspondem às amostras e por colunas que apresentam o conjunto de variáveis. Ao aplicar a PCA a matriz original (X) é decomposta em três matrizes: *scores* (T), transposta de *loadings* (P^t), e matriz de resíduos não explicados pelo modelo (E). Na decomposição da matriz X , novas variáveis são criadas, sendo estas ortogonais entre si chamadas de componentes principais (PCs). (ERIKSSON et al., 2006).

$$X = T \cdot P^t + E$$

As componentes principais contém a variância dos conjuntos de dados, sendo que a maior porcentagem das variâncias é explicada pelas primeiras componentes principais. Sendo assim, a primeira componente principal (PC1) é a que explica a maior quantidade da variância, a segunda componente principal (PC2) é a PC que explica a segunda maior quantidade de variância, assim sucessivamente com as demais PCs. (FERREIRA et al., 1999; ROGGO et al., 2007; SHIN et al., 2010).

Através das novas matrizes é possível gerar gráficos de *scores* e de *loadings* escolhendo duas ou três PCs, de modo a se obter gráficos bidimensionais ou tridimensionais, respectivamente, permitindo uma melhor avaliação dos conjuntos de dados e de suas variáveis. O gráfico de *scores* apresenta as coordenadas das amostras dadas pelas PCs, permitindo reconhecer padrões através do agrupamento de amostras (amostras próximas entre si) ou diferenciação das mesmas (amostras distantes entre si). No gráfico de *loadings* se observa os pesos das variáveis originais na separação entre os grupos de amostras representadas pelo gráfico de *scores*, esses pesos são dados para cada PC. (MUNSON et al., 2005; ROBOTTI et al., 2016).

3.4.3 ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) surgiu na década de 1960 por Herman Wold, sendo o método de modelagem mais utilizado nas análises quimiométricas. (GELADI et al., 1986; HUBERT et al., 2003; ABDI et al., 2010).

A análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é um método de reconhecimento de padrões supervisionados, que consiste em estabelecer uma relação entre duas matrizes, uma denominada matriz X que contém dados das variáveis independentes (como por exemplo, espectros de infravermelho) e outra matriz denominada Y que possui os dados das variáveis dependentes (classificação das amostras). (BARTHUS et al., 2005; BYLESJO et al., 2006; ABDI et al., 2010).

Assim como no PCA o PLS-DA decompõe as matrizes originais (matriz X e Y), criando novas variáveis ortogonais entre si, que no caso do PLS, são denominadas variáveis latentes (VLs). (FERREIRA et al., 1999).

Para a construção do modelo é necessário escolher a quantidade de variáveis latentes a ser mantida. A quantidade de VLs é escolhida através da validação cruzada, uns dos métodos mais utilizados são: por *Venetian blinds* e por *Leave one out*. No sistema *Venetian blinds* as amostras são divididas em dois grupos, um para a calibração e outro para a previsão do modelo. (BALLABIO et al., 2013). No sistema *Leave one out* uma amostra é retirada do conjunto de calibração e esta é usada como objeto de previsão, esse sistema é realizado com todas as amostras retirando uma de cada vez até que todas tenham passado pela previsão. (BRERETON, 2003).

Outro mérito importante é a detecção de amostras anômalas (*outliers*), essa etapa é fundamental na construção do modelo de calibração, pois garante um conjunto de calibração homogêneo. Para a detecção de *outliers* existem diversos métodos, porém um dos mais simples é a observação de duas grandezas: *leverage* e resíduos de *Students*. (FERREIRA et al., 1999). *Leverage* está relacionado com a distância do centróide das amostras, portanto, altos valores de *leverage* significam que uma determinada amostra apresenta alta influência no modelo de regressão. (FREITAS et al., 2013). Os resíduos de *Students* é a diferença entre os dados

originais e os dados previstos pelo modelo. Portanto as amostras são consideradas anômalas, aquelas que apresentarem altos valores de *leverage* e altos valores de *Students*, devendo ser retirada do modelo. (BARTHUS et al., 2005).

Realizada a validação do método para determinação do número de VLs e verificada a presença de amostras anômalas, deve-se em seguida realizar a validação externa. Na validação externa, as amostras padrões que não participaram do conjunto de calibração são utilizadas no teste de previsão realizada pelo modelo. Essa etapa é fundamental para testar a especificidade e a sensibilidade do modelo na previsão de amostras externas. Depois de avaliado a conformidade de todos os méritos, o modelo por PLS-DA está apto para predizer amostras desconhecidas.

3.4.4 USO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS

No controle de qualidade de fitoterápicos geralmente são utilizados métodos para identificação e quantificação de um ou mais marcadores químicos. Entretanto, este tipo de análise não fornece uma avaliação geral sobre o produto, muitas vezes não são suficientes para garantir a autenticidade da planta medicinal, pois determinados compostos que são utilizados como marcadores não são exclusivos de determinada espécie de planta. (LEÃO, 2010; GAD et al., 2012).

Diante desse fato a análise de *fingerprint* químico é a mais recomendada para o controle de qualidade de fitoterápicos. Muitas técnicas podem ser utilizadas para esse fim, como: cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), cromatografia a gás (CG), ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV), entre outras. (ZENG et al., 2008; GAD et al., 2012).

A utilização dessas técnicas resulta em dados complexos, que apresentam dificuldade na interpretação, principalmente em amostras distintas com perfis químicos semelhantes, em que não é possível garantir a autenticidade do material vegetal apenas pela simples análise visual. (LEÃO, 2010).

Devido à dificuldade em analisar resultados com grandes quantidades de informações, o uso da quimiometria tornou-se uma ferramenta valiosa para esse tipo de análise. (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Dentre as técnicas que são utilizadas em conjunto com a quimiometria, a espectroscopia de infravermelho se apresenta como uma poderosa ferramenta para

o controle de qualidade. A técnica além de apresentar diversas vantagens, tais como, baixo custo, fácil preparo da amostra e rapidez na análise (SUN et al., 2010; LI et al., 2013; ROHMAN et al., 2014), pode ser empregada aliada a quimiometria para diferenciação de origem de cultivo, adulteração e diferenciação de espécies. (YAP et al., 2006; FENG et al., 2007; ROHAETI et al., 2015).

Na literatura são descritos inúmeros trabalhos utilizando a espectroscopia de infravermelho para controle de qualidade de plantas medicinais. As principais aplicações são em relação à quantificação de compostos presentes na espécie vegetal, determinação da origem geográfica e discriminação entre espécies. (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, 2011).

Estudo realizado por Li et al. (2016), demonstrou a possibilidade de determinar a origem de amostras da espécie *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Moon família Apocynaceae utilizando o infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}). *Marsdenia tenacissima* é famosa por sua propriedade anticancerígena, porém exemplares cultivados na província de Yunnan na China possuem um valor diferenciado no comércio de plantas medicinais. Esse atrativo econômico possibilita a prática de adulteração, onde exemplares de *Marsdenia tenacissima* de outras regiões são vendidos como pertencentes à província de Yuannan, de modo a se obter vantagens financeiras. Nesse contexto Li et al. (2016) obteve a discriminação das espécies por regiões através do gráfico de scores utilizando PCA. Além da análise por PCA foram construídos modelos quimiométricos de classificação, utilizando o método do vizinho mais próximo (KNN, do inglês *k-nearest neighbor*), onde foram testados diferentes tipos de pré-processamento, e o *Wavelet de-noising* (WD) foi o melhor, obtendo 100% de acerto na previsão de amostras durante a validação externa.

Em 2015, Wei et al. desenvolveram um método por espectroscopia de infravermelho para discriminação entre a espécie *Dendrobium officinale* Kimura & Migo das demais espécies do gênero. Essa espécie é conhecida na medicina chinesa por possuir várias propriedades farmacológicas, como por exemplo, anticâncer, vasodilatadora e como ativadora do sistema imunológico. *D. officinale* se destaca dentre as espécies do gênero por possuir grande valor comercial no mercado chinês, por esse motivo essas plantas são constantemente alvos de adulterações. Desse modo o estudo utilizou análise por reflectância difusa na região NIR (10000 a 4000 cm^{-1}) para o controle de qualidade dessa espécie. Uma PCA

testando diferentes pré-processamentos como, por exemplo, padronização normal de sinal (SNV), alisamento por Savitzki-Golay e correção do espalhamento multiplicativo (MSC). Nesse caso, o pré-processamento por MSC em conjunto com o alisamento por Savitzki-Golay, foi o que apresentou a melhor separação entre amostras de *D. officinale* das demais espécies do gênero.

Nesse mesmo contexto, Lucio-Gutierrez et al. (2013) realizaram a discriminação da espécie *Panax ginseng* C.A. Mey. de outras espécies de *Panax*, e de espécies de outros gêneros, como: *Angelica*, *Eleutherococcus*, *Lepidium*, *Withania* e *Pfaffia*. *P. ginseng* possui propriedades farmacológicas reconhecidas na medicina oriental, como anticâncer, antidiabética, anti-inflamatória, entre outras. Porém ocorrem muitas adulterações com esta espécie, em que se vendem outras espécies do mesmo e de diferentes gêneros. Como controle de qualidade para esta espécie, o estudo em questão utilizou análises por reflectância difusa na região NIR em 10000 a 4000 cm^{-1} . A PCA nesse estudo demonstrou uma boa separação entre as amostras das diferentes espécies, utilizando padronização normal de sinal (SNV) como pré-processamento. Além da PCA, também foi construído um modelo utilizando PLS-DA, em que demonstrou boa capacidade de predição para classificação de amostras de *P. ginseng*.

A técnica de espectroscopia por infravermelho associado à quimiometria tornou-se uma poderosa ferramenta para determinar a autenticidade de plantas medicinais, sobretudo pela ampla possibilidade na área de controle de qualidade. Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo desenvolver um método analítico por esta técnica para discriminação de espécies de *Baccharis* da seção *Caulopterae*, e agregar ao controle de qualidade de *B. trimera*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

As coletas das partes aéreas floridas das espécies de *Baccharis* (Tabela 1) foram realizadas nos municípios de Curitiba - PR, Piraquara - PR e Pelotas - RS. A identificação botânica dos exemplares foi realizada pelo taxonomista Dr. Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado.

TABELA 1 – ESPÉCIES DE *Baccharis* COLETADAS, QUANTIDADE DE EXEMPLARES, PERÍODO DA COLETA E LOCALIZAÇÃO DA COLETA.

Espécies	Número de amostras	Data da Coleta	Localização
<i>Baccharis articulata</i>	30	Abril/2015 Julho/2016 Outubro/2016	Curitiba - PR Pelotas - RS
<i>Baccharis junciformis</i>	10	Julho/2016	Pelotas - RS
<i>Baccharis milleflora</i>	10	Abril/2015 Outubro/2016	Piraquara - PR
<i>Baccharis myriocephala</i>	15	Abril/2015 Outubro/2016	Curitiba - PR Piraquara - PR
<i>Baccharis trimera</i>	36	Julho/2016	Pelotas - RS

FONTE: O autor (2016).

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

O material botânico foi seco em temperatura ambiente durante duas semanas. O material seco foi fragmentado empregando-se um moinho de facas e posteriormente foi pulverizado com auxílio de almofariz e pistilo utilizando nitrogênio líquido. Em seguida os pós das plantas secas foram padronizados através de um tamis com abertura de malha de 250 μm (60 MESH). Após a padronização granulométrica, as amostras foram armazenadas em tubo tipo falcon até o momento da análise por infravermelho.

Previamente as análises por infravermelho, testes em triplicata foram realizados analisando amostras pulverizadas sem diluição em brometo de potássio (KBr) e amostras diluídas em diferentes proporções de amostra para KBr (Tabela 2).

Para as diluições, as amostras e o KBr foram pesados utilizando uma balança analítica. As diluições foram realizadas por diluição geométrica, onde a

amostra foi adicionada em gral de ágata e em seguida foi adicionado um volume equivalente de KBr, realizando a homogeneização da mistura com o auxílio de um pistilo de ágata, continuando o processo de adição de KBr até que a toda a quantidade fosse incorporado e homogeneizado.

TABELA 2 – RELAÇÃO PESO/PESO (mg) DE AMOSTRA EM PÓ DE *Baccharis* e KBr

Proporção	Amostra	KBr
1:200	5	1000
1:150	5	750
1:100	10	1000
1:50	10	500
1:30	20	600
1:20	20	400
1:5	20	200
1:2	40	80

FONTE: O autor (2016)

4.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

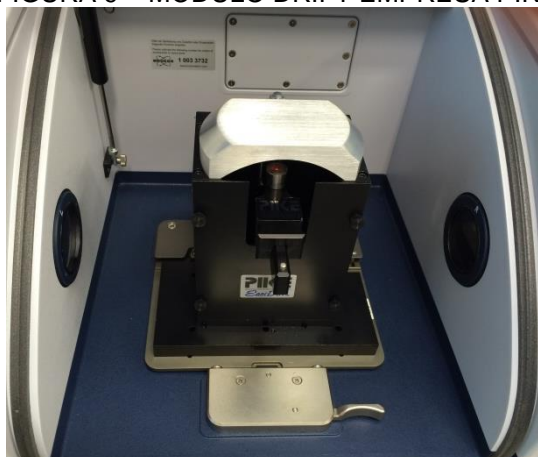
As análises por espectroscopia de infravermelho foram realizadas no equipamento Espectrofotômetro de Infravermelho baseado em Transformada de Fourier (FT-IR), modelo Vertex 70 da empresa Bruker (Figura 8), equipado com o módulo DRIFT da marca Pike (Figura 9). Os espectros foram adquiridos por refletância na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) e na região do infravermelho próximo (10000 a 4000 cm^{-1}), realizando testes com diferentes números de scans e de resolução.

FIGURA 8 – ESPECTROFOTÔMETRO DE INFRAVERMELHO BASEADO EM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR), MODELO VERTEX 70, EMPRESA BRUKER



Fonte: O autor (2016).

FIGURA 9 – MÓDULO DRIFT EMPRESA PIKE



Fonte: O autor (2016).

4.4 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

Os espectros de infravermelho adquiridos das amostras pulverizadas de *Baccharis* foram organizados no software Origin Pro 2015 (OriginLab), formando colunas correspondentes às amostras e linhas correspondendo as variáveis (intensidade de absorção). Os dados espectrais foram importados para o software Matlab 7.0.1® (Mathworks) empregando-se PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvetor Research), e então procederam as análises de componentes principais (PCA) e as análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

4.4.1 Análise de Componentes Principais – PCA

Para PCA, a matriz contendo os dados espectrais foi importada para o software Matlab, e então realizou-se a transposição da mesma. Com a matriz transposta foram realizadas diversas análises por PCA com diferentes tipos de pré-processamento, como: MSC, SNV, dados centrados na média, autoescalamiento, *detrend*, 1ª e 2ª derivada com alisamento. Para a escolha do número de componentes principais a serem utilizadas na PCA foi plotado o gráfico de autovalores *versus* número de componentes principais. Em seguida foi obtido o gráfico de *scores* de modo a obter a melhor discriminação entre as espécies de *Baccharis*. Ao determinar o gráfico de *scores* com a melhor separação entre os grupos de amostras, o gráfico de *loadings* foi construído com intuito de determinar as variáveis (número de onda) responsáveis pela discriminação entre as amostras.

4.4.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA

Os modelos de classificação por PLS-DA foram construídos utilizando-se um conjunto de calibração correspondente a 75% dos espectros obtidos das amostras de *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata*, *Baccharis junciformis*, *Baccharis milleflora* e *Baccharis myriocephala*, sendo os 25% restantes reservados para validação externa.

Na construção do modelo, utilizou-se a matriz X composta pelos dados espectrais das amostras, e a matriz Y, composta pelas classes das amostras (espécies). Essas matrizes passaram por pré-processamento, em que testou-se diferentes métodos para cada modelo PLS-DA. Os métodos testados de pré-processamentos foram: MSC, SNV, dados centrados na média, autoescalamiento, *detrend*, 1ª e 2ª derivada com alisamento.

Posteriormente ao pré-processamento, o conjunto de calibração passou por validação cruzada por *leave one out*. Então o gráfico da raiz quadrática dos erros de validação (RMSECV) *versus* número de variáveis latentes (LV) foi obtido, onde determinou-se o número de LVs que apresentasse o menor valor de RMSECV.

Para a verificação de amostras anômalas, o gráfico de *leverage versus* resíduos de *Students* foi plotado. Onde o limite para resíduos de *Students* é igual a 2,5 e -2,5, e o limite de *leverage* é determinado através da equação abaixo:

$$Limite = \frac{3.LV}{n}$$

Onde:

LV é o número de variáveis latentes utilizadas para construção do modelo

n é o número de amostras pertencentes ao conjunto de calibração.

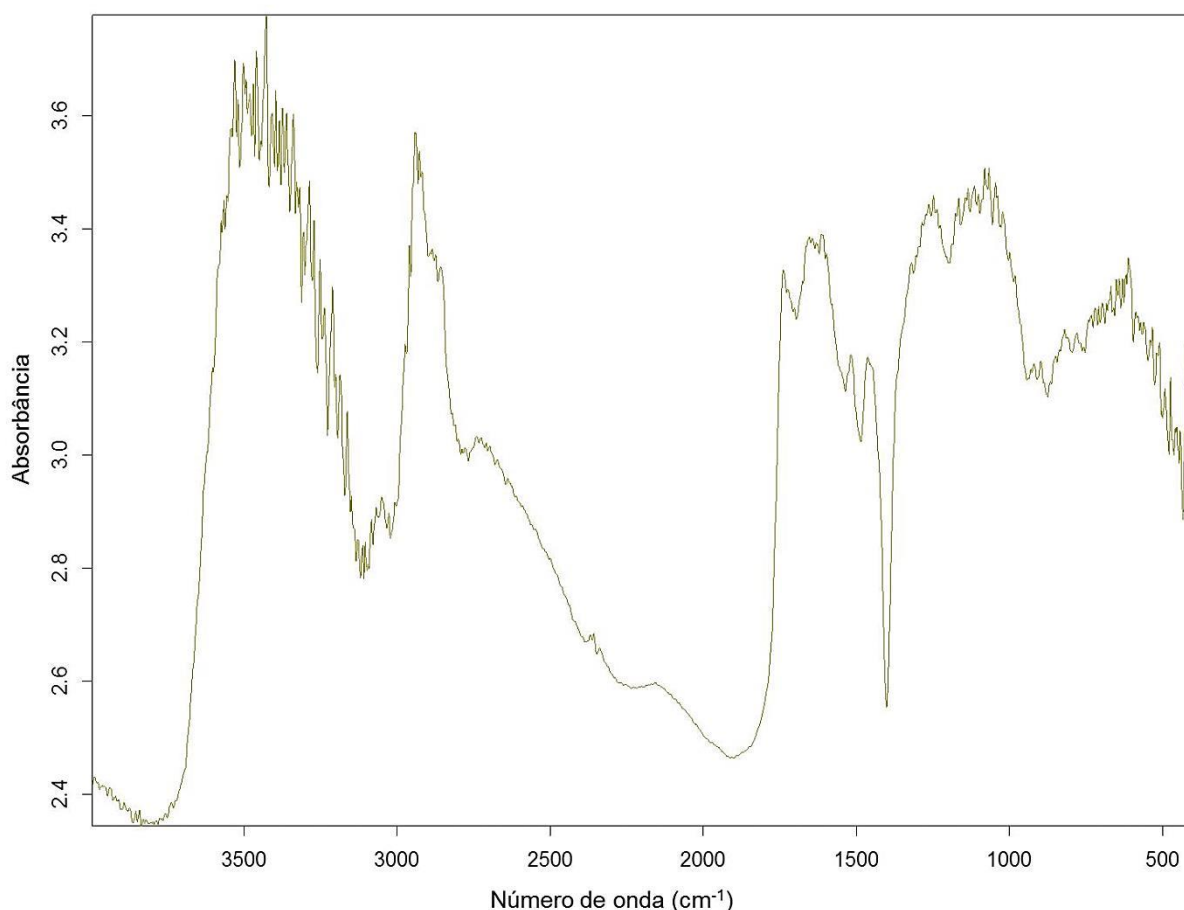
Em seguida, para avaliar a eficiência de predição do modelo foi realizada a validação externa, utilizando os 25% dos espectros das amostras de *Baccharis*, que não participaram na construção do modelo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE POR INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) E PRÓXIMO (NIR)

O espectro de MIR obtido por DRIFT de amostra pulverizada de *Baccharis* sem KBr (Figura 10), apresentou bandas com muito ruído e sem boa definição, isso se deve a complexidade e a concentração da amostra, podendo ser minimizado pela diluição da amostra em KBr. (DANDEY et al., 1997; NASAR et al., 2014).

FIGURA 10 – ESPECTRO DE MIR DE UMA AMOSTRA DE *Baccharis* SEM DILUIÇÃO EM KBr



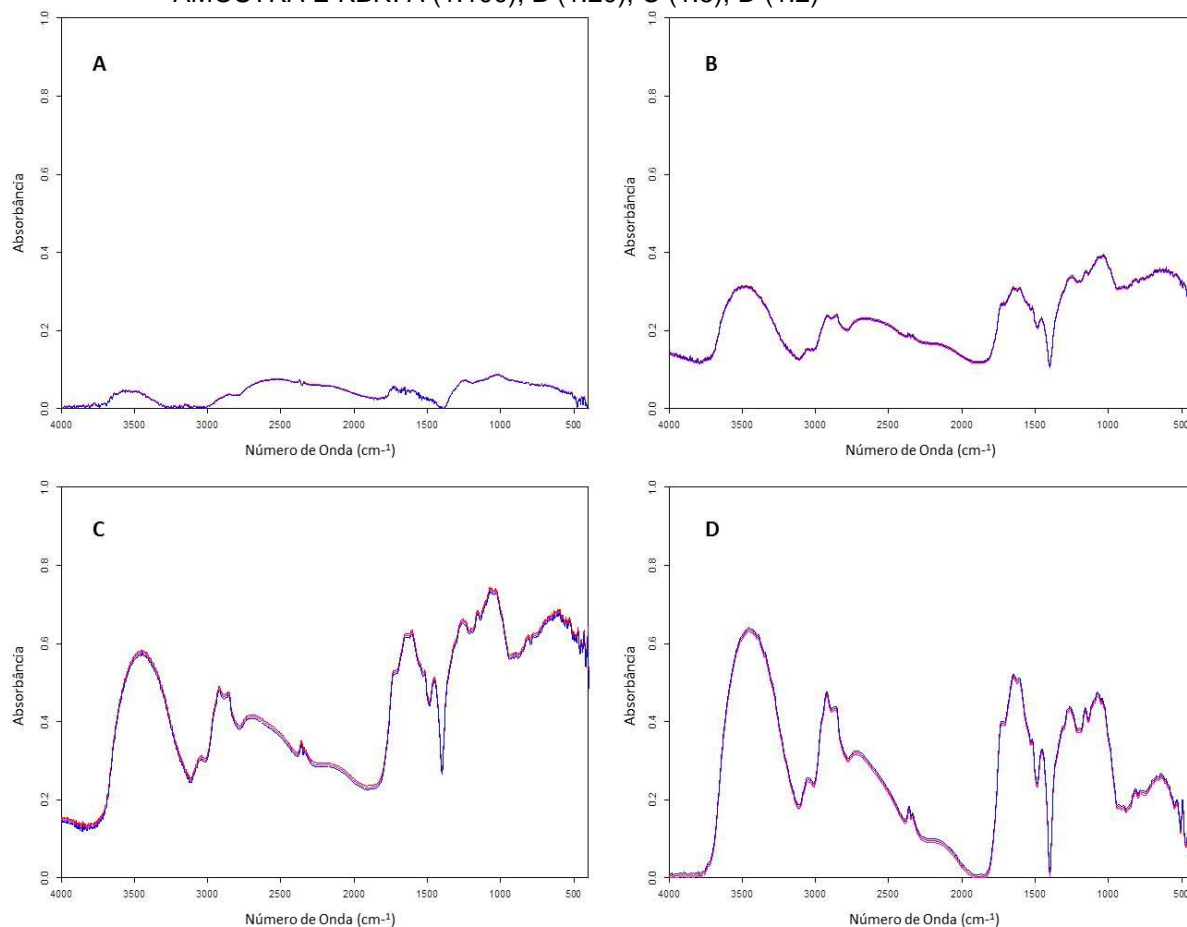
FONTE: O autor (2016).

Com o intuito de melhorar a definição das linhas espectrais, foram realizados diferentes testes de diluição da amostra pulverizada com diferentes proporções de KBr. Esse mérito apresenta grande importância, pois espectros com

bandas nítidas são fundamentais para o bom desempenho das análises quimiométricas.

As diluições utilizadas foram: 1:100, 1:50, 1:30, 1:20, 1:5 e 1:2 (p/p) de amostra pulverizadas para KBr, respectivamente. Na Figura 11 são representados espectros obtidos de testes em triplicata de algumas dessas diluições (Tabela 2).

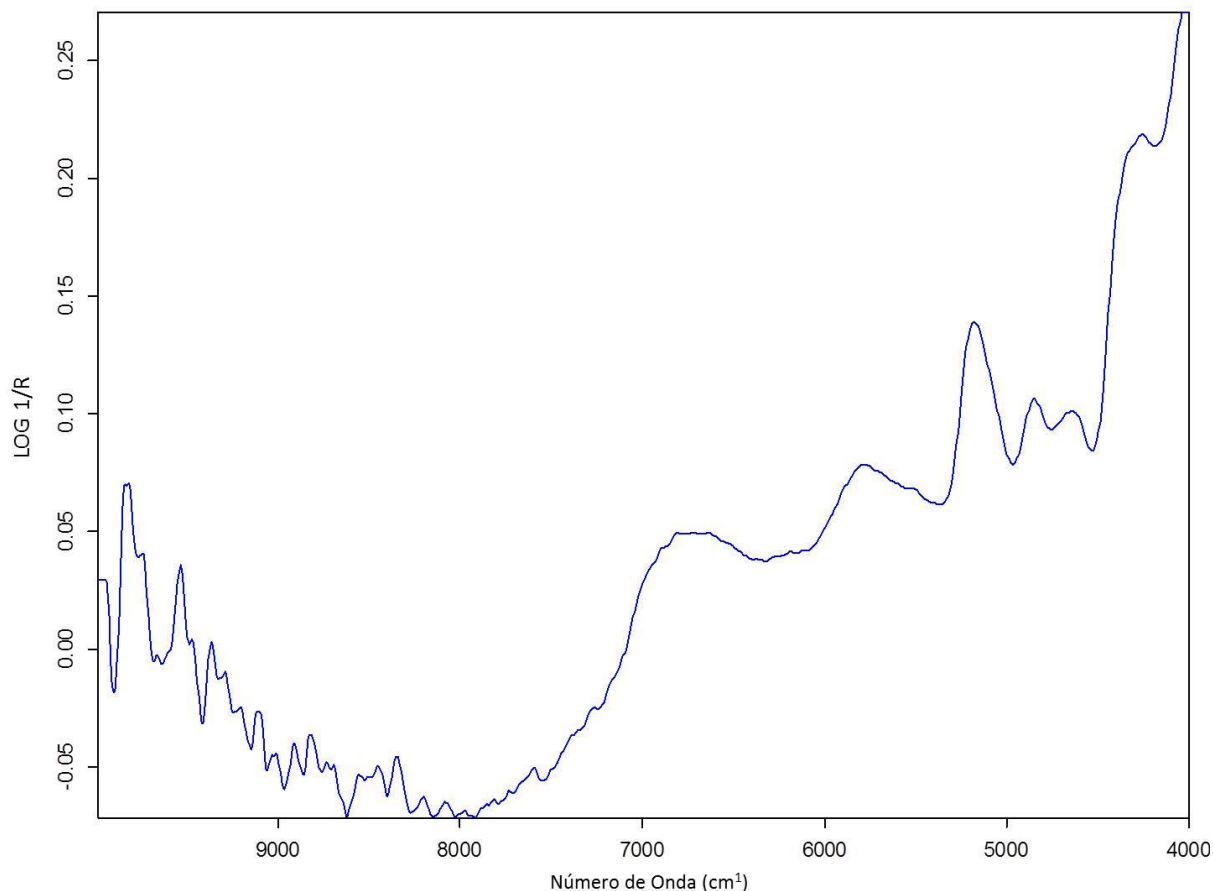
FIGURA 11 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO MÉDIO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE AMOSTRA E KBr: A (1:100); B (1:20); C (1:5); D (1:2)



FONTE: O autor (2015).

Analisando os espectros obtidos dos testes de diluição, constatou-se que a proporção 1:2 (p/p) de amostra para KBr apresentou o melhor espectro de infravermelho médio (Figura 11-D). As bandas desse espectro se apresentaram bem definidas e com boa intensidade, possibilitando a identificação de bandas características da região MIR.

O espectro de NIR sem KBr obtido por DRIFT de *Baccharis* apresentou bandas com boa definição (Figura 12), não necessitando de diluição com KBr, Portanto as demais análises na região NIR foram realizadas diretamente das amostras pulverizadas.

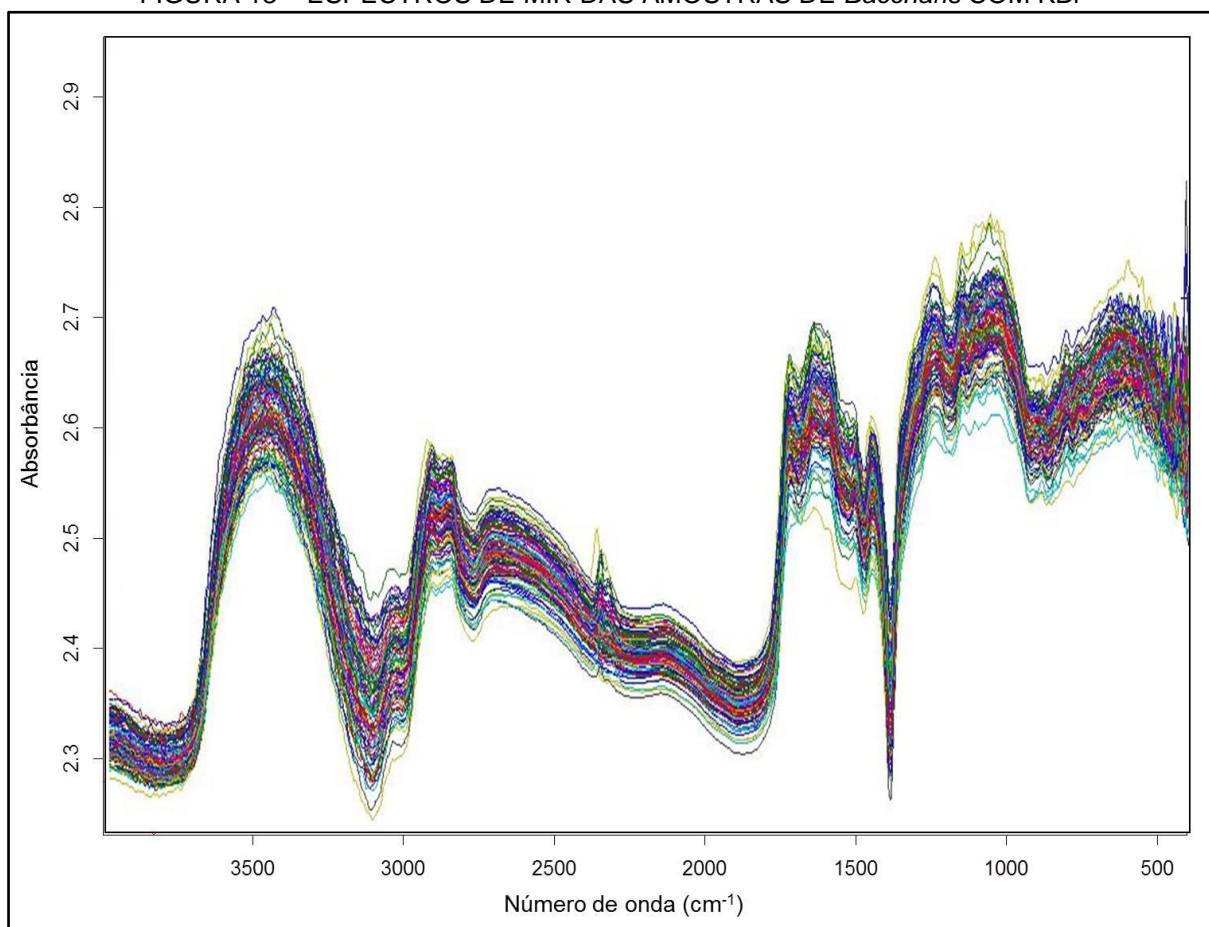
FIGURA 12 – ESPECTRO DE NIR DE UMA AMOSTRA DE *Baccharis* SEM DILUIÇÃO EM KBr

FONTE: O autor (2016).

5.2 AVALIAÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

Na Figura 13 estão presentes os espectros de todas as amostras de *Baccharis* analisadas por infravermelho médio (Tabela 1). Por simples análise visual dos espectros, não é possível observar diferença entre os mesmos, portanto para diferenciações das amostras através dos espectros foi necessário o uso de análises quimiométricas.

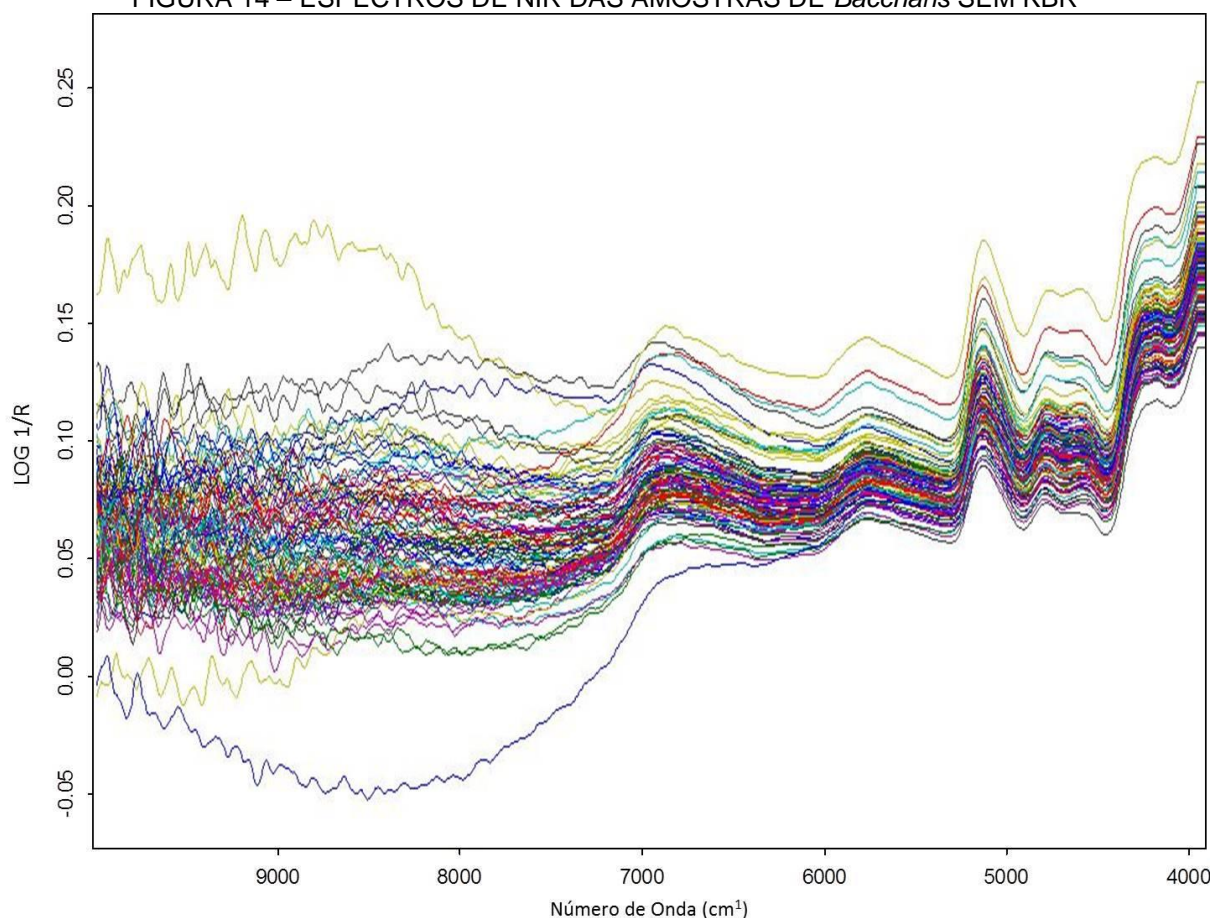
No espectro MIR, o número de onda em 2350 cm^{-1} apresenta a banda de estiramento de CO_2 , que exibiu grande oscilação de intensidade entre os espectros, dessa maneira a região entre 2435 a 2320 cm^{-1} foi removida de todos os espectros.

FIGURA 13 – ESPECTROS DE MIR DAS AMOSTRAS DE *Baccharis* COM KBr

FONTE: O autor (2016)

Na Figura 14 estão representados os espectros NIR de todas as amostras de *Baccharis* (Tabela 1). Através da análise visual dos espectros também não foi possível evidenciar diferenças entre os mesmos, desse modo procedeu-se as análises quimiométricas para verificar a possível diferenciação.

Conforme observado, os espectros NIR na região entre 10000 a 7220 cm^{-1} apresentaram somente ruídos sem nenhuma banda visível, dessa maneira essa região foi removida de modo a não prejudicar as análises quimiométricas.

FIGURA 14 – ESPECTROS DE NIR DAS AMOSTRAS DE *Baccharis* SEM KBR

FONTE: O autor (2016).

5.3 ANÁLISE POR COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DOS ESPECTROS MIR E NIR

Os espectros de MIR e NIR passaram por diferentes pré-processamentos com o intuito de minimizar variações sistemáticas e variações aleatórias, de modo a se obter a melhor discriminação entre as espécies. Para o pré-processamento foram testados diferentes métodos tais como: MSC, SNV, dados centrados na média, autoescalamiento, *detrend*, 1ª e 2ª derivada com alisamento.

Entre os pré-processamento empregados para os espectros de MIR, o que apresentou a melhor discriminação entre as espécies foi a combinação de autoescalamiento e *detrend*. Entretanto para os espectros de NIR o melhor pré-processamento foi a combinação de dados centrados na média e *detrend*.

Para a análise exploratória primeiramente foi realizada a PCA entre *B. trimera* com as demais espécies separadamente (*B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. myriocephala*), e posteriormente, a PCA de todas as espécies

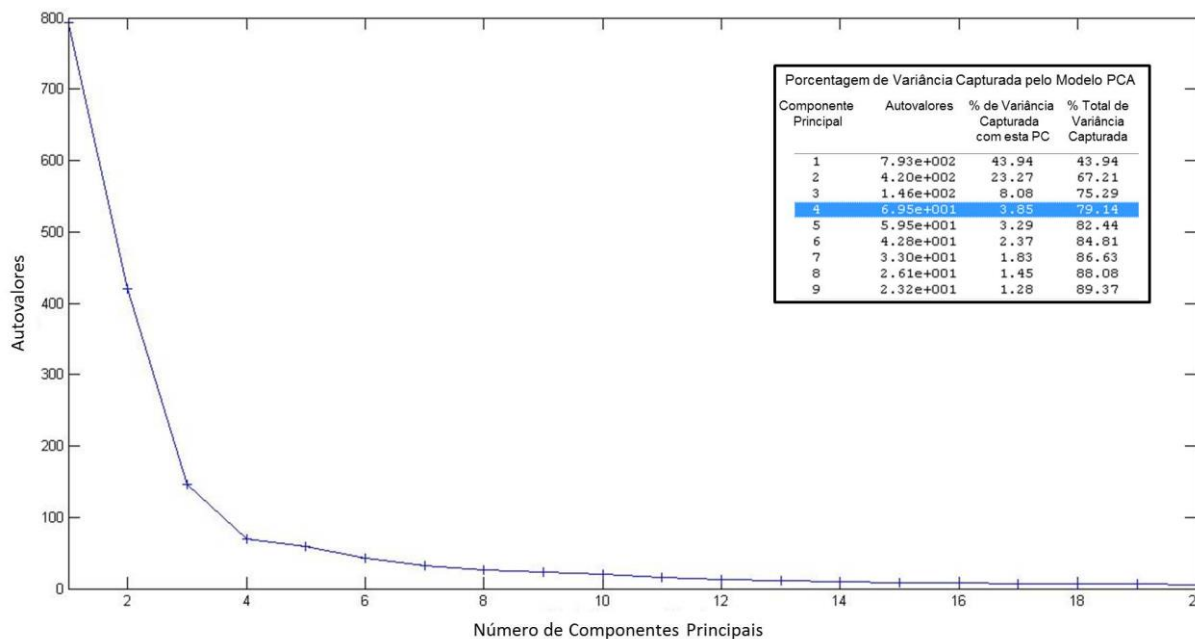
simultaneamente. O objetivo dessas análises foi obter a discriminação (gráfico de *scores*) entre as espécies e a identificação de quais variáveis foram responsáveis por essas diferenciações (gráfico de *loadings*).

5.3.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NO MIR

Os espectros obtidos na região do MIR das amostras de 36 *B. trimera* e 29 *B. articulata*, foram organizados em matriz, formada por 65 linhas (amostras), e por 1805 colunas (variáveis) referentes às intensidades de absorbância dos números de ondas.

A primeira etapa na análise por PCA foi determinar o número de componentes principais (PCs) a serem utilizados na análise. Para este propósito o número de PCs foi determinado através do gráfico de autovalores (variância acumulada explicada) *versus* número de PCs. Na Figura 15 é possível verificar que para esta determinação, valores superiores a 4 PCs não contribuíram significativamente com o aumento no acúmulo da variância explicada. Deste modo as 4 primeiras PCs foram utilizadas para a PCA, gerando um acúmulo de 79,14% da variância explicada dos dados originais.

FIGURA 15 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NA REGIÃO MIR

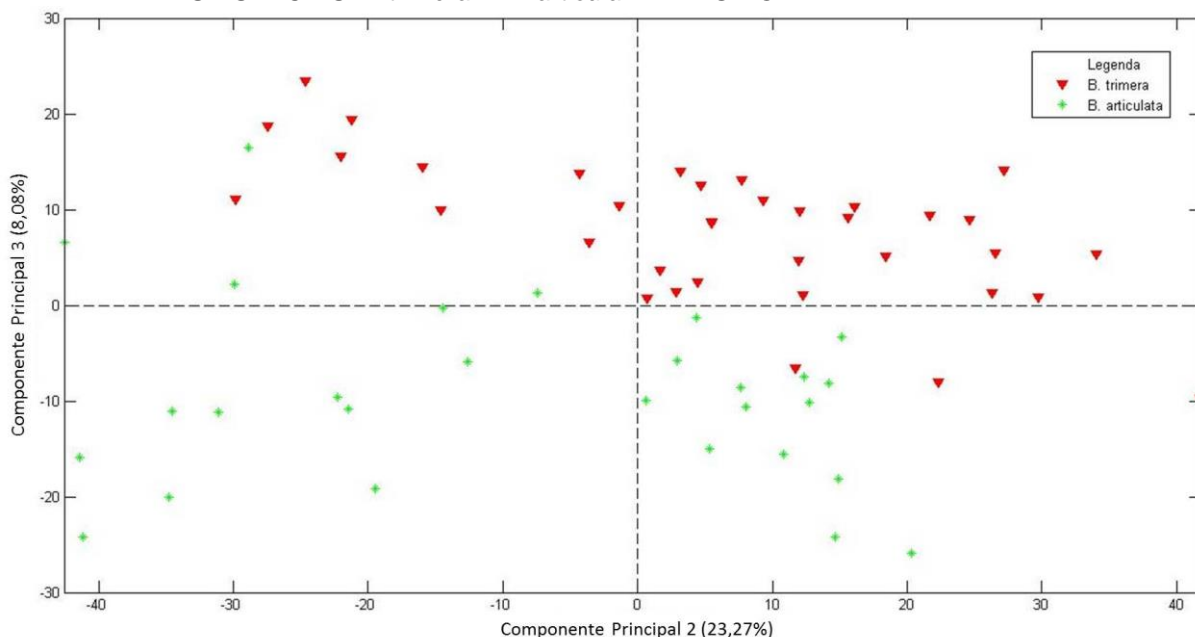


FONTE: O autor (2016).

Determinado o número de PCs, o gráfico de *scores* foi construído de modo a verificar a separação entre as amostras de *B. trimera* e de *B. articulata*. Os eixos do gráfico de *scores* são formados pelas PCs, como por exemplo, no gráfico da Figura 16 em que o eixo x representa a PC2 e o eixo y a PC3, onde as mesmas formam eixos de coordenadas. (PRADO et al., 2002). Através das PCs é possível localizar a posição das amostras no gráfico e consequentemente determinar quais as PCs responsáveis pela discriminação entre as amostras.

A Figura 16 apresenta o gráfico de *scores*, formado pelas PC2 e PC3 que explicam 23,27% e 8,08% da variância, respectivamente, que em conjunto representou 31,35%. Conforme representado no gráfico, a maioria das amostras de *B. trimera* se localizou ao lado positivo de PC3, enquanto que a maioria das amostras de *B. articulata* se localizou ao lado negativo dessa mesma PC. Os resultados demonstram a discriminação entre as duas espécies, onde se verifica a existência de similaridade entre espectros de amostras da mesma espécie e diferenças entre espectros de amostras de espécies distintas.

FIGURA 16 – GRÁFICO DE SCORES DE PC3 VERSUS PC4 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NA REGIÃO MIR



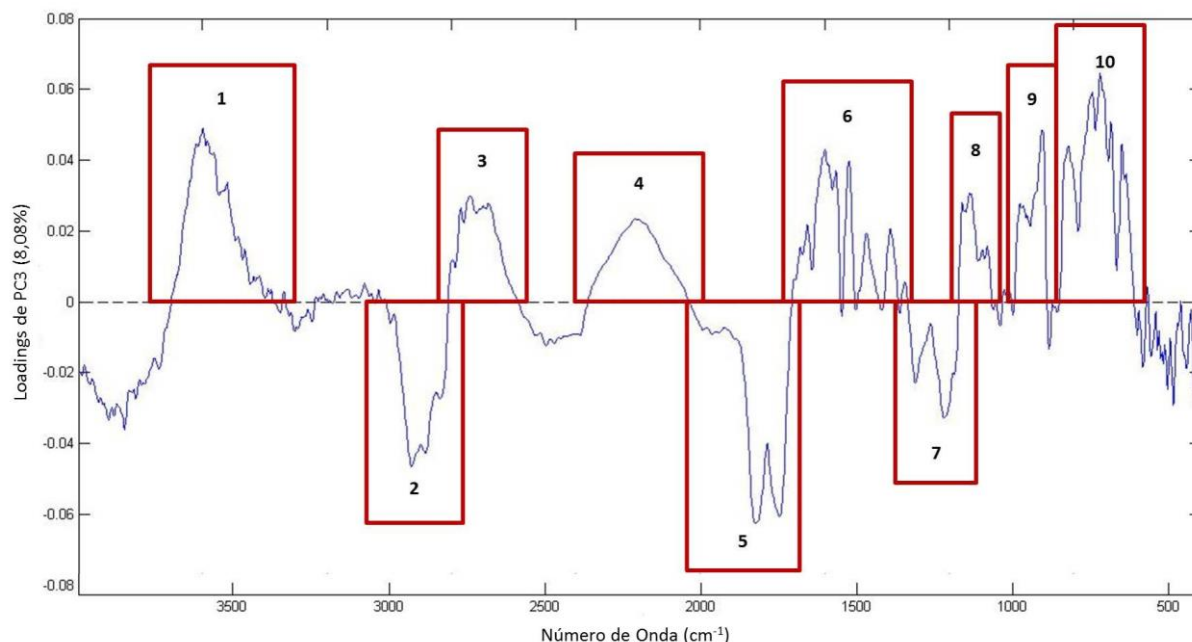
FONTE: O autor (2016).

Após a discriminação entre as amostras, o gráfico de *loadings* foi construído de modo a determinar as variáveis (números de ondas) responsáveis pela separação entre as amostras de *B. trimera* e *B. articulata*. Como demonstrado no gráfico de *scores*, a PC3 foi a responsável pela discriminação dos grupos de amostras, dessa maneira a análise dos pesos das variáveis na separação foi realizada através do gráfico de *loadings* de PC3.

O gráfico de *loadings* de PC3 (Figura 17) demonstra que no lado positivo estão presentes 7 regiões, correspondentes as variáveis que mais contribuíram para a discriminação. As regiões ao lado positivo foram: região 1 - 3707 a 3425 cm^{-1} com bandas de estiramento de grupamento OH; região 3 - 2848 a 2648 cm^{-1} onde estão presentes bandas de estiramento OH de ácidos carboxílicos; região 4 - 2289 a 2009 cm^{-1} correspondentes a bandas de combinação de anéis aromáticos; região 6 - 1662 a 1342 cm^{-1} onde estão presentes bandas de estiramento de grupos de C=C de anéis aromáticos; região 8 - 1149 a 1051 cm^{-1} onde estão presentes bandas de estiramentos de grupo C-O; região 9 - 975 a 877 cm^{-1} e região 10 - 876 a 804 cm^{-1} onde apresentam bandas de deformação angular fora do plano de C-H de anéis aromáticos. No lado negativo do gráfico de *loadings* estão presentes 3 regiões que mais contribuíram para a discriminação, que foram: região 2 - 3037 a 2854 cm^{-1} que apresenta bandas de estiramento assimétrico de CH_2 e simétrico de CH_2 e CH_3 ;

região 5 - 1971 a 1670 cm^{-1} que corresponde ao estiramento de C=O; e região 7 - 1307 a 1151 cm^{-1} que apresentam bandas de estiramento de C-O.

FIGURA 17 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* e *B. articulata* NA REGIÃO MIR



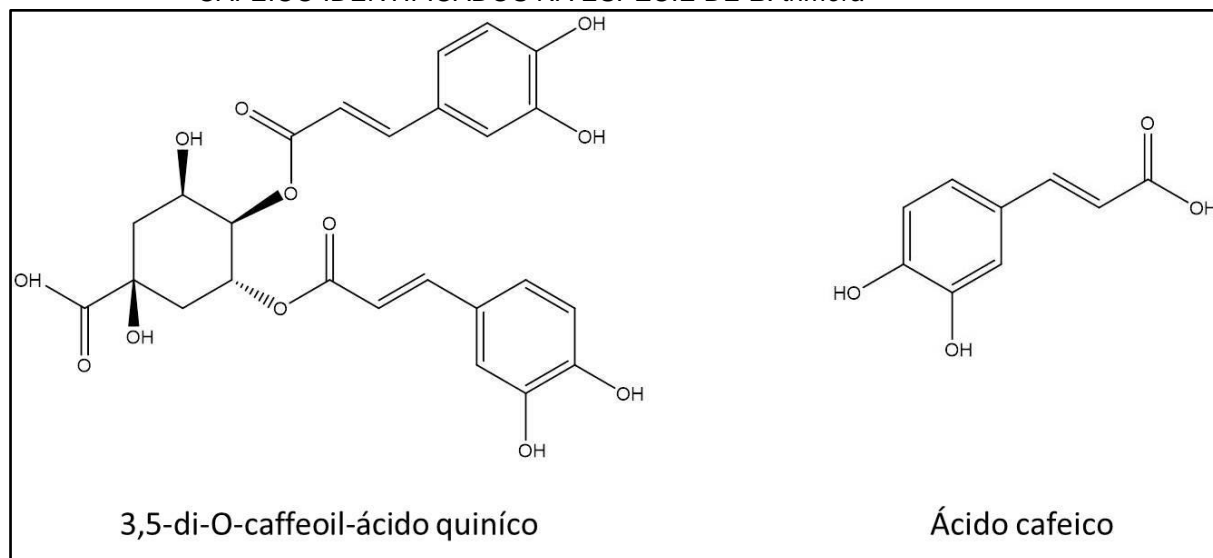
FONTE: O autor (2016).

Através da análise das regiões positivas de *loadings* de PC3 foi possível identificar os grupos funcionais responsáveis pela diferenciação entre as espécies, tais como: OH, OH de ácido carboxílico, C=O e anel aromático. Com base nessas informações é possível inferir que amostras de *B. trimera* podem apresentar maiores concentrações de compostos da classe dos ácidos fenólicos, corroborando com os dados da literatura, em que demonstram inúmeros relatos de identificação dessa classe de compostos em exemplares de *B. trimera*. Na Figura 18 estão representadas dois exemplos de ácidos fenólicos já identificados em *B. trimera*. (VERDI et al., 2005; GARCIA et al., 2014; ZIELINSKI et al., 2014; ARAUJO et al., 2016; CAMPOS et al., 2016).

Ao avaliar as regiões negativas de *loadings* de PC3 foram identificados os seguintes grupos funcionais: CH₂, CH₃, C=O e C-O. Tais grupos contribuíram para o agrupamento das amostras de *B. articulata*, que com base na literatura, demonstra que possíveis compostos envolvidos sejam da classe dos flavonoides, pois a maioria dos compostos identificados em exemplares de *B. articulata* é dessa classe. Na

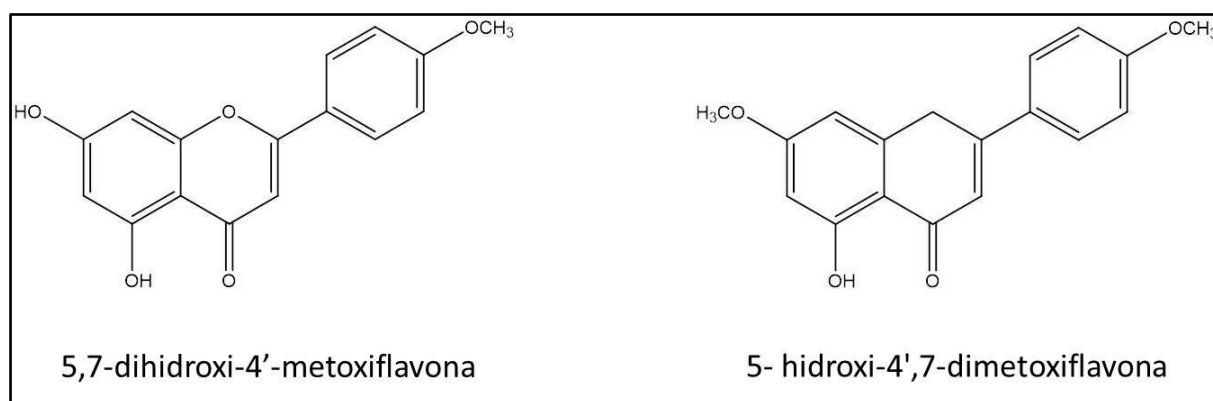
Figura 19 estão representados dois flavonoides identificados em exemplares de *B. articulata*. (VERDI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014).

FIGURA 18 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS 3,5-DI-O-CAFFEOIL-ÁCIDO QUINÍCO E ÁCIDO CAFEICO IDENTIFICADOS NA ESPÉCIE DE *B. trimera*



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 19 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS 5,7-DIHIDROXI-4'-METOXIFLAVONA E 5-HIDROXI-4',7-DIMETOXIFLAVONA IDENTIFICADOS NA ESPÉCIE DE *B. articulata*



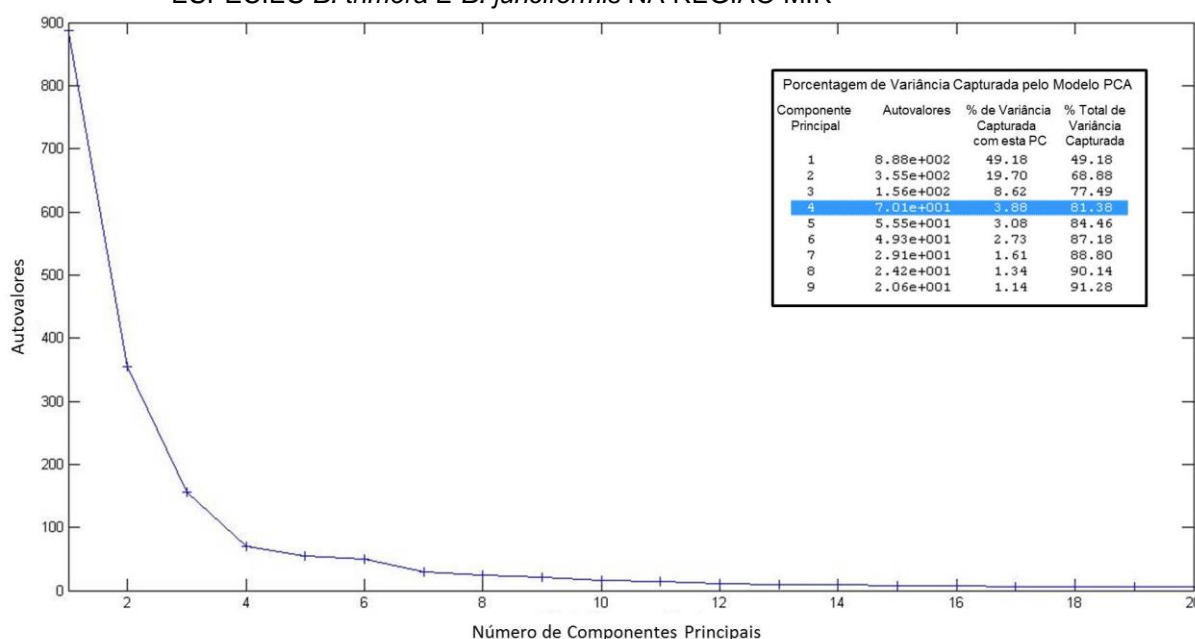
FONTE: O autor (2016).

5.3.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NO MIR

Na discriminação por PCA das amostras de 36 *B. trimera* e de 11 *B. junciformis*, os dados de MIR das amostras foram organizados em matriz, resultando em 47 linhas e em 1805 colunas.

Para a determinação do número de PC a ser utilizado na PCA, o gráfico de autovalores *versus* número de componentes principais foi plotado (Figura 20). Como observado no gráfico, valores superiores a 4 PCs não resultaram em aumento significativo na variância explicada. Portanto, foram utilizadas 4 PCs para análise por PCA, em que resultou em 81,38% da variância explicada.

FIGURA 20 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NA REGIÃO MIR

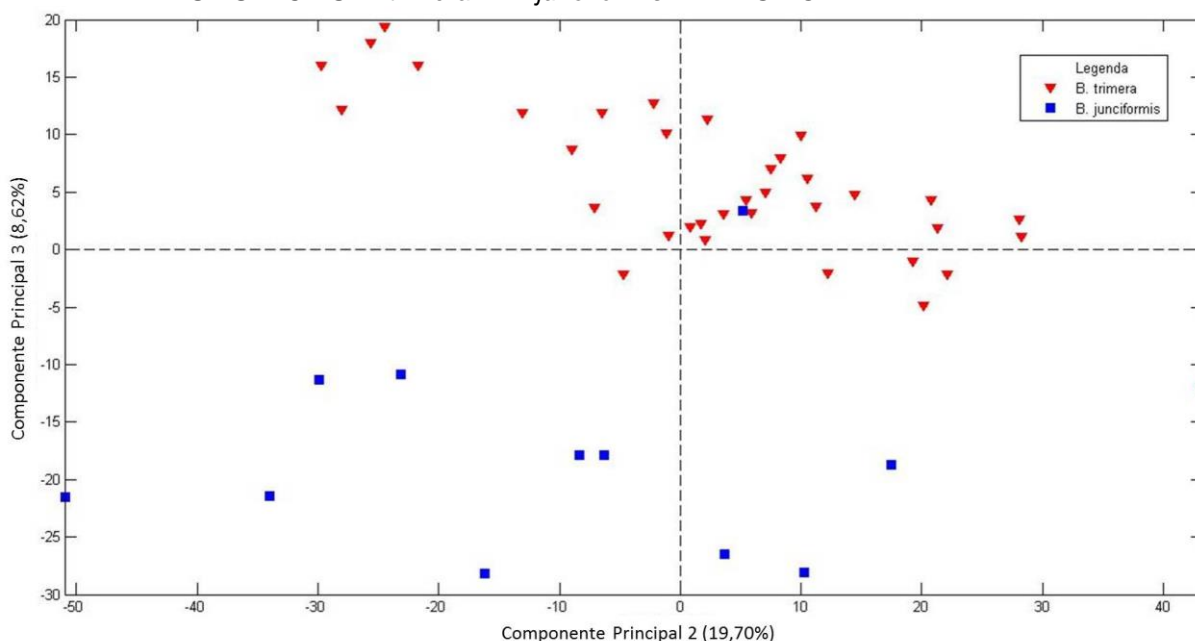


FONTE: O autor (2016).

Após a escolha do número de PC, o gráfico de *scores* foi construído para verificar a discriminação entre as amostras de *B. trimera* e *B. junciformis*. Conforme a Figura 21, o gráfico de *scores* foi formado pelas PCs 2 e 3, em que apresentaram 19,70% e 8,62%, respectivamente da variância explicada, que em conjunto representou 28,32% da variância explicada.

O gráfico de *scores* demonstrou a discriminação entre as espécies, onde as amostras de *B. trimera* se apresentaram ao lado positivo de PC3, e amostras de *B. junciformis* ao lado negativo dessa mesma PC.

FIGURA 21 – GRÁFICO DE SCORES DE PC2 VERSUS PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NA REGIÃO MIR

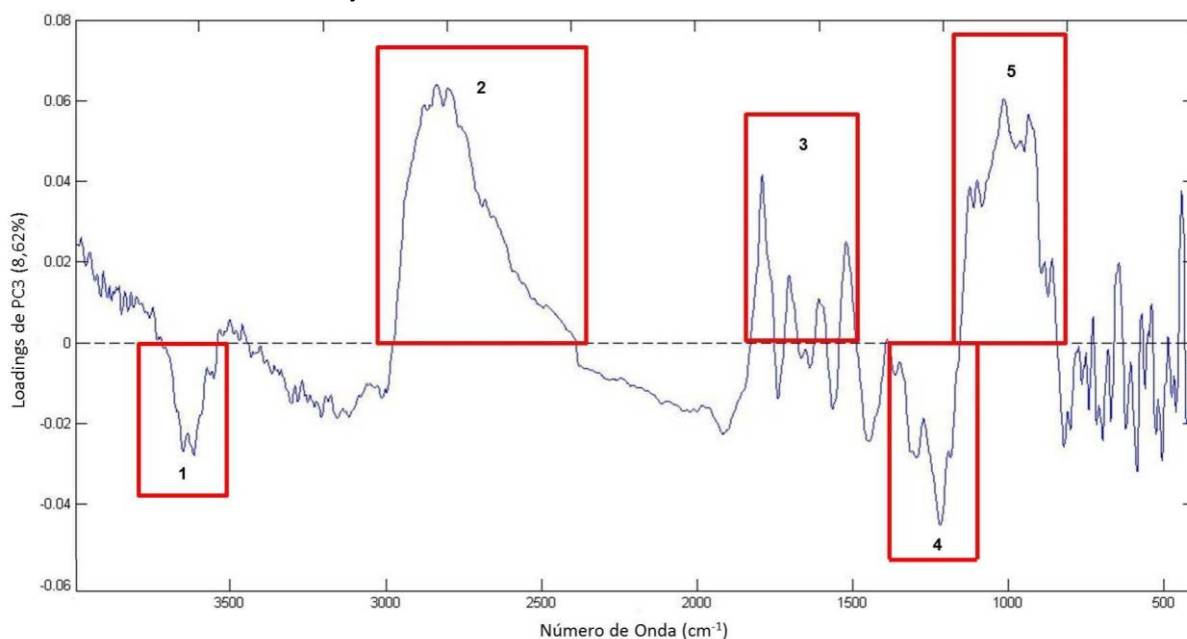


FONTE: O autor (2016).

Como indicado no gráfico de *scores*, a discriminação entre as espécies ocorreu através da PC3, assim para análise do peso das variáveis nessa separação, o gráfico de *loadings* de PC3 foi plotado (Figura 22).

A avaliação do gráfico de *loadings* de PC3 demonstrou que ao lado positivo estão presentes 3 regiões: região 2 - 3000 a 2474 cm^{-1} que corresponde a bandas de estiramento assimétrico de CH_2 , estiramento simétrico de CH_2 e CH_3 , e estiramento de OH de ácidos carboxílicos; região 3 - 1778 a 1456 cm^{-1} onde localiza bandas de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ e de estiramento de $\text{C}=\text{C}$ de anéis aromáticos; e região 5 - 1126 a 826 cm^{-1} onde estão presentes bandas de estiramento de $\text{C}-\text{O}$ e de vibração fora do plano de $\text{C}-\text{H}$ de anéis aromáticos. O lado negativo por sua vez está presente as seguintes regiões: região 1 - 3716 a 3558 cm^{-1} referente a banda de estiramento de OH; e região 4 - 1348 a 1130 cm^{-1} onde apresenta bandas de estiramento de $\text{C}-\text{O}$.

FIGURA 22 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NA REGIÃO MIR

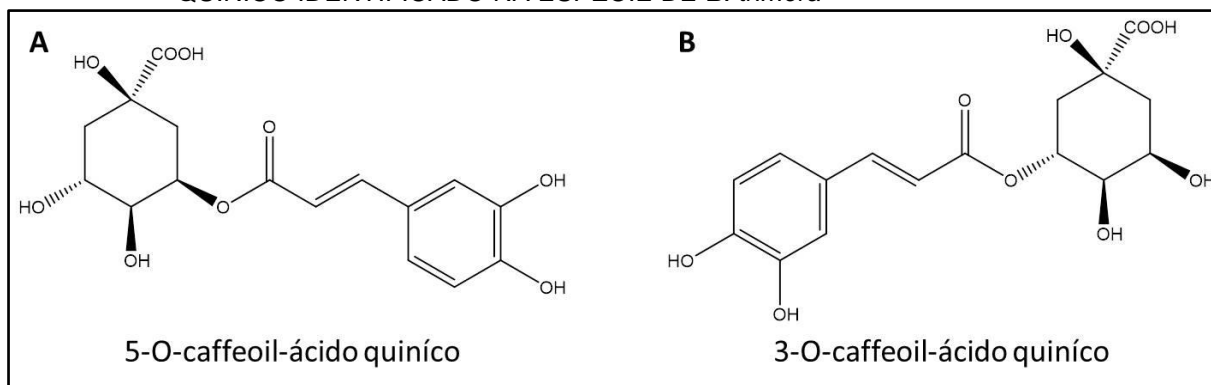


FONTE: O autor (2016).

A análise das regiões positivas de *loadings* de PC3 demonstrou a presença de grupos funcionais, tais como: OH de ácido carboxílico, CH₂, CH₃, anel aromático, e C-O. Tais grupos contribuíram para o agrupamento das amostras de *B. trimera*, podendo inferir que tais compostos são da classe dos ácidos fenólicos. (VERDI et al., 2005; GARCIA et al., 2014; ZIELINSKI et al., 2014; ARAUJO et al., 2016; CAMPOS et al., 2016). A região negativa de *loadings* de PC3 apresentou os grupos OH e C-O.

Os compostos da classe dos ácidos fenólicos são comumente identificados em exemplares de *B. trimera* e *B. junciformis*. Porém a maioria dos compostos relatados em exemplares de *B. junciformis* já foi identificada em exemplares de *B. trimera*, portanto a possível diferença química entre as espécies em questão pode ser atribuída à quantidade e/ou os diferentes compostos de uma mesma classe. A Figura 23-A apresenta um exemplo de ácido fenólico identificado em ambas às espécies e a Figura 23-B um composto identificado na espécie *B. trimera*, porém ainda não relatado na espécie *B. junciformis*. (SIMÕES-PIRES et al., 2005; ABAD & BERMEJO, 2006; OLIVEIRA et al., 2014).

FIGURA 23 – ESTRUTURA DO COMPOSTO 5-O-CAFFEOL-ÁCIDO QUÍNICO IDENTIFICADO NAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* E DO COMPOSTO 3-O-CAFFEOL-ÁCIDO QUÍNICO IDENTIFICADO NA ESPÉCIE DE *B. trimera*



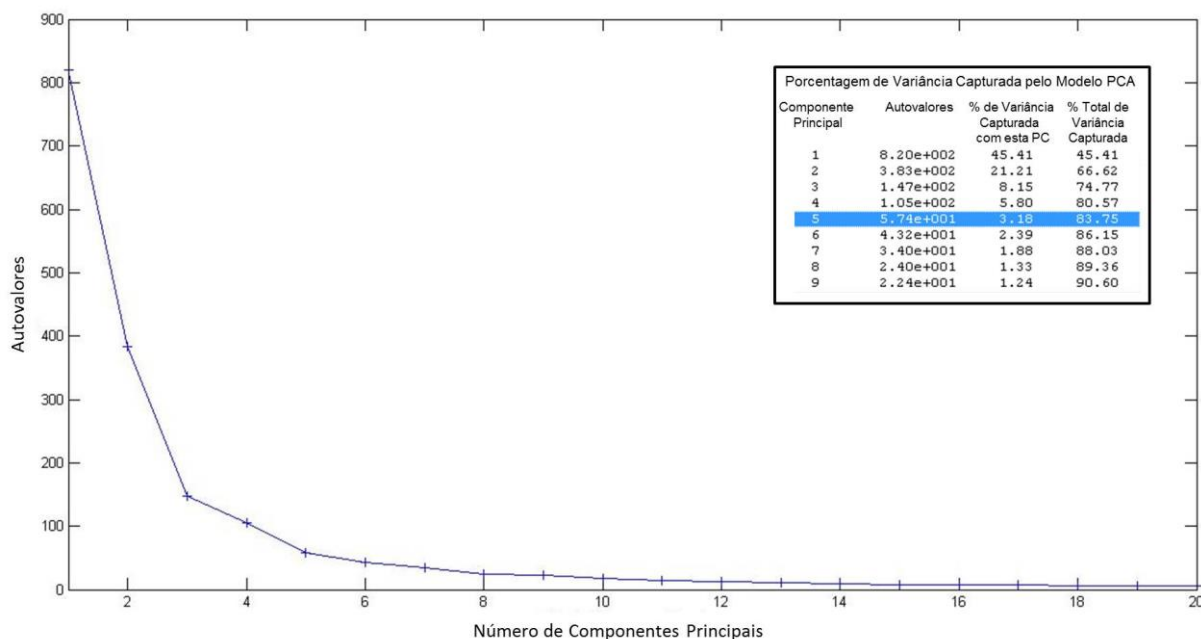
FONTE: O autor (2016).

5.3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NO MIR

Na análise de PCA das amostras de 36 *B. trimera* e 14 *B. milleflora* os dados de infravermelho médio das amostras foram organizados em matriz, apresentando 50 linhas e 1805 linhas.

O gráfico de autovalores *versus* número de PCs (Figura 24), demonstrou que valores de número de PCs superiores a 5 não contribuíram em acúmulo significativo de variância explicada, por esse motivo as 5 primeiras PCs foram utilizadas para compor a PCA, resultando em 83,75% da variância explicada.

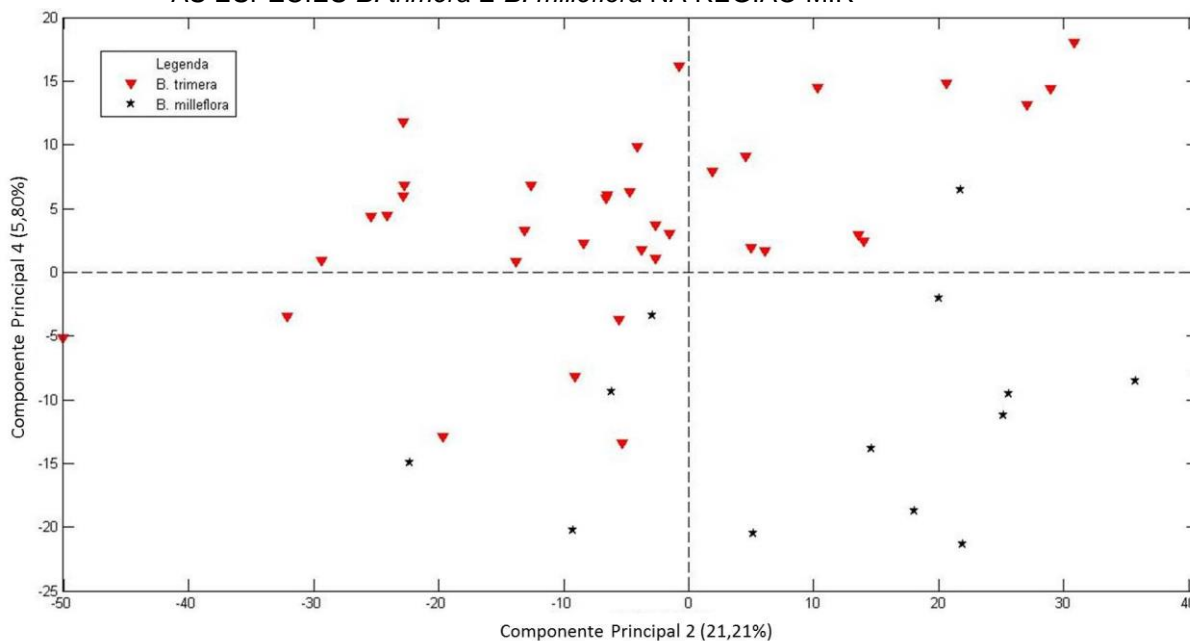
FIGURA 24 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

Posteriormente a escolha do número de PCs, o gráfico de *scores* para a discriminação entre as espécies foi plotado (Figura 25). O gráfico foi constituído pelas PC2 e PC4 que representaram 21,21% e 5,80% da variância explicada, respectivamente, representando 27,01% da variância explicada. A análise do gráfico de *scores* demonstrou que a maioria das amostras de *B. milleflora* ficou localizada no quadrante composto pelo lado positivo de PC2 e negativo de PC4, e as amostras de *B. trimera* se localizaram nos demais quadrantes.

FIGURA 25 - GRÁFICO DE SCORES DE PC2 VERSUS PC4 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NA REGIÃO MIR

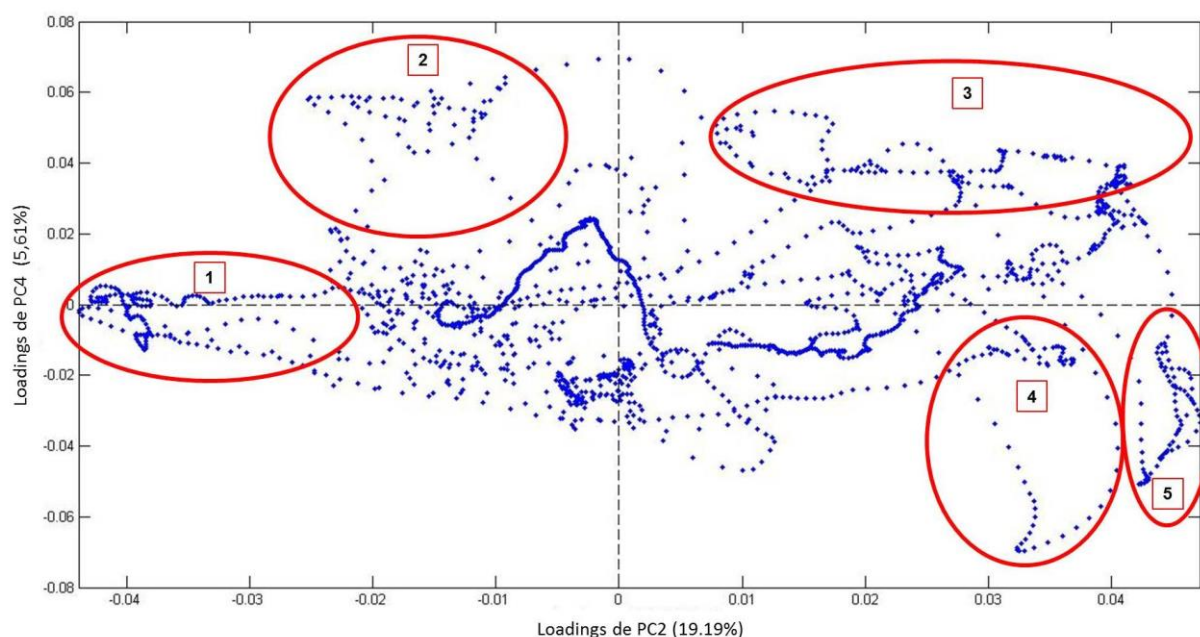


FONTE: O autor (2016).

Como observado anteriormente na análise do gráfico de scores, a discriminação entre as espécies ocorreu pelas PC2 e PC4 em conjunto, desse modo a análise dos pesos das variáveis procedeu pela avaliação do gráfico de *loadings* de PC2 versus PC4 (Figura 26).

A análise do gráfico de *loadings* de PC2 versus PC4 foi realizada através do quadrante onde se localizaram o conjunto de amostras de *B. milleflora* (região 4 e 5), e os demais quadrantes onde se localizaram as amostras de *B. trimera* (região 1,2 e 3). As regiões importantes para a discriminação entre as duas espécies foram: região 1 - 3265 a 2980 cm^{-1} correspondente ao estiramento de OH e de OH de ácido carboxílicos, e 1440 a 1380 cm^{-1} de estiramento de C-O; região 2 - 964 a 698 cm^{-1} correspondente a deformação angular fora do plano de C-H de anel aromático; região 3 - 3680 a 3516 cm^{-1} em que apresenta estiramento de OH, 1766 a 1737 cm^{-1} onde apresenta estiramento de C=O, e 1145 a 975 cm^{-1} onde localiza bandas de estiramento de C-O; região 4 - 1732 a 1669 cm^{-1} que apresentam bandas de estiramento de C=O; e região 5 - 1317 a 1153 cm^{-1} caracterizado por apresentar bandas de estiramento de C-O.

FIGURA 26 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC2 *VERSUS* PC4 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

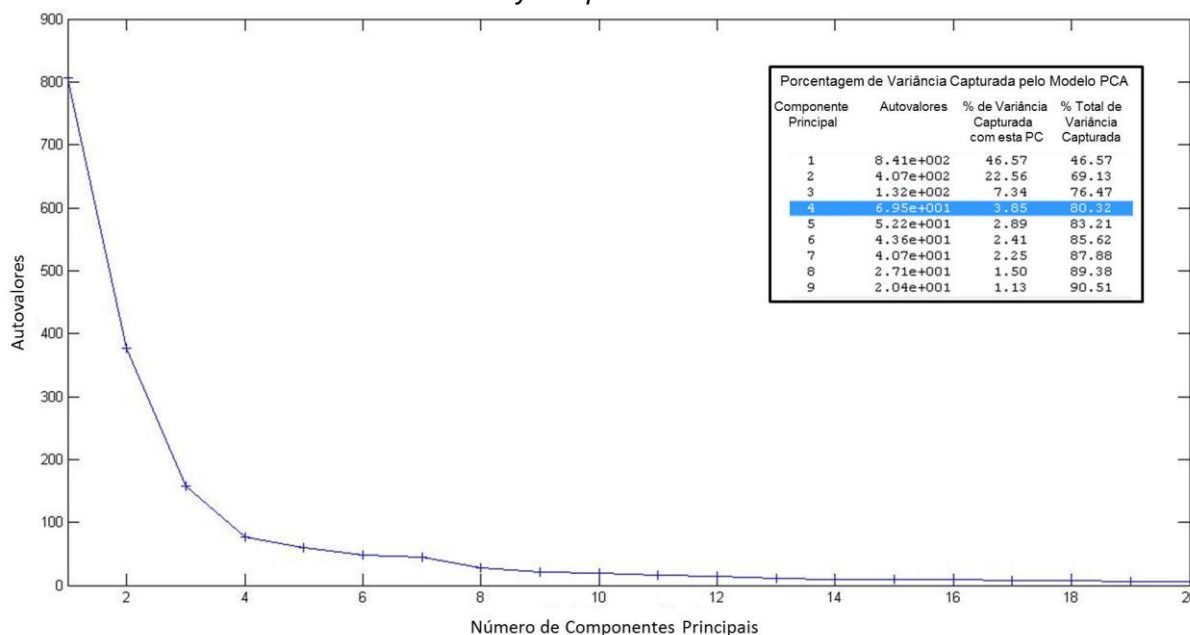
A avaliação dos pesos das variáveis onde estão presentes as amostras de *B. trimera* demonstrou a presença de alguns grupos funcionais, tais como: OH, OH de ácido carboxílico, C=O, e anel aromático, grupos característicos de ácidos fenólicos. As variáveis onde estão as amostras de *B. milleflora* apresentaram grupos funcionais tais como: C=O e C-O, porém estudos químicos dessa espécie são escassos apresentando somente estudo de óleo essencial, dificultando a conexão dos dados obtidos com a literatura. (SIMOES et al., 2005).

5.3.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NO MIR

Os espectros obtidos na região do MIR das amostras de 36 *B. trimera* e 16 *B. myriocephala*, foram organizados em matriz, formada por 52 linhas e 1805 colunas.

Conforme o gráfico de autovalores *versus* número de componentes principais (Figura 27), número de PC maior que 4 não contribuiu significativamente para o aumento do acúmulo da variância explicada. Dessa forma, as 4 primeiras PCs foram escolhidas para compor a PCA, gerando um acúmulo de 80,32% da variância explicada dos dados originais.

FIGURA 27 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NA REGIÃO MIR

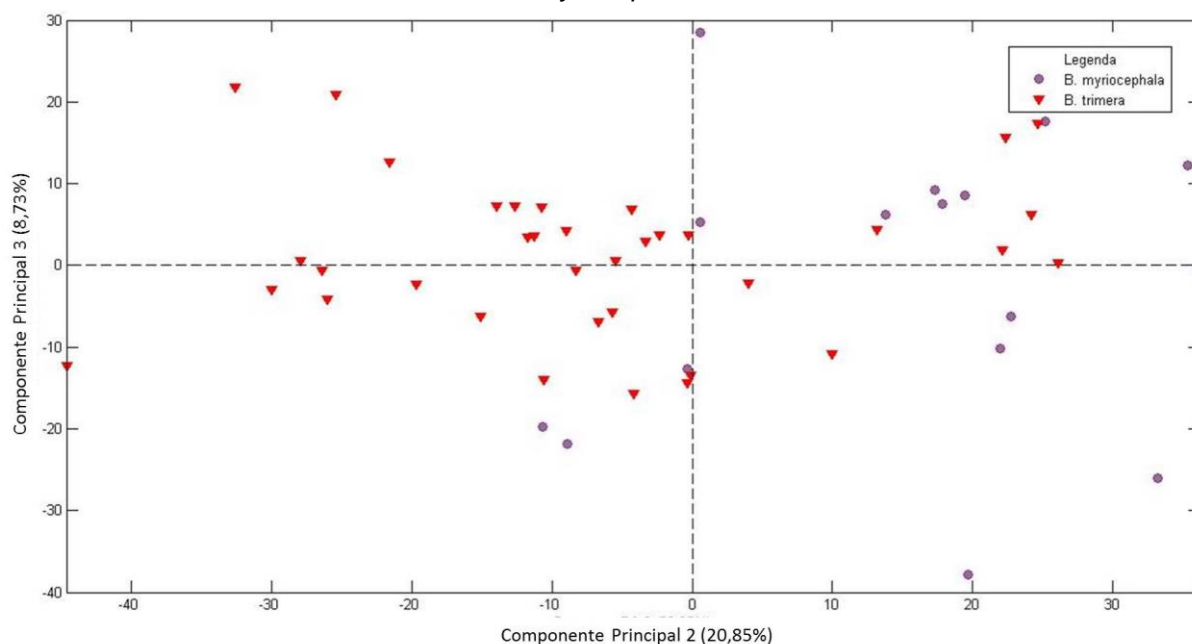


FONTE: O autor (2016).

Após determinado o número de PCs para análise de PCA, o gráfico de scores foi construído (Figura 28). O gráfico foi formado pelas PC2 e PC3, representando 20,85% e 8,73% da variância explicada respectivamente, que em conjunto explicaram 29,58% da variância dos dados espectrais.

Como demonstrado no gráfico de scores, não houve discriminação entre as amostras de *B. trimera* e *B. myriocephala*. O resultado do gráfico de scores evidenciou grande similaridade entre os espectros das amostras de *B. trimera* e de *B. myriocephala*.

FIGURA 28 – GRÁFICO DE SCORES DE PC2 VERSUS PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

Além da dificuldade de discriminação entre as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* pela PCA na região MIR, a escassez de estudos químicos relacionados à identificação de compostos presentes em *B. myriocephala*, dificulta a comparação química entre estas duas espécies. Apesar da dificuldade em se obter informações químicas de *B. myriocephala*, os gráficos de scores demonstraram grande similaridade química entre as espécies. Nesse sentido, é possível inferir que amostras de *B. myriocephala* apresentam classes de compostos semelhantes às de *B. trimera*.

A similaridade entre os exemplares ou a dificuldade de identificação relativa à *B. trimera* com as demais espécies da seção *Caulopterae*, vem sendo discutida por vários autores, como por exemplo, estudo realizado por Muller (2006), onde o autor propôs que *Baccharis genistelloides* subsp. *crispa* (Spreng.) Joch. Müll. apresentaria como sinonímia as espécies de *B. trimera*, *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. e *B. myriocephala*, porém Oliveira et al., 2006 rejeitaram essa nova combinação. Heiden et al., 2012 tem relatado o equívoco por alguns autores na identificação botânica entre *B. trimera* e *B. myriocephala*. Este problema tem sido sanado parcialmente, através da correção dos nomes das espécies nas fichas catalográficas depositadas nos herbários.

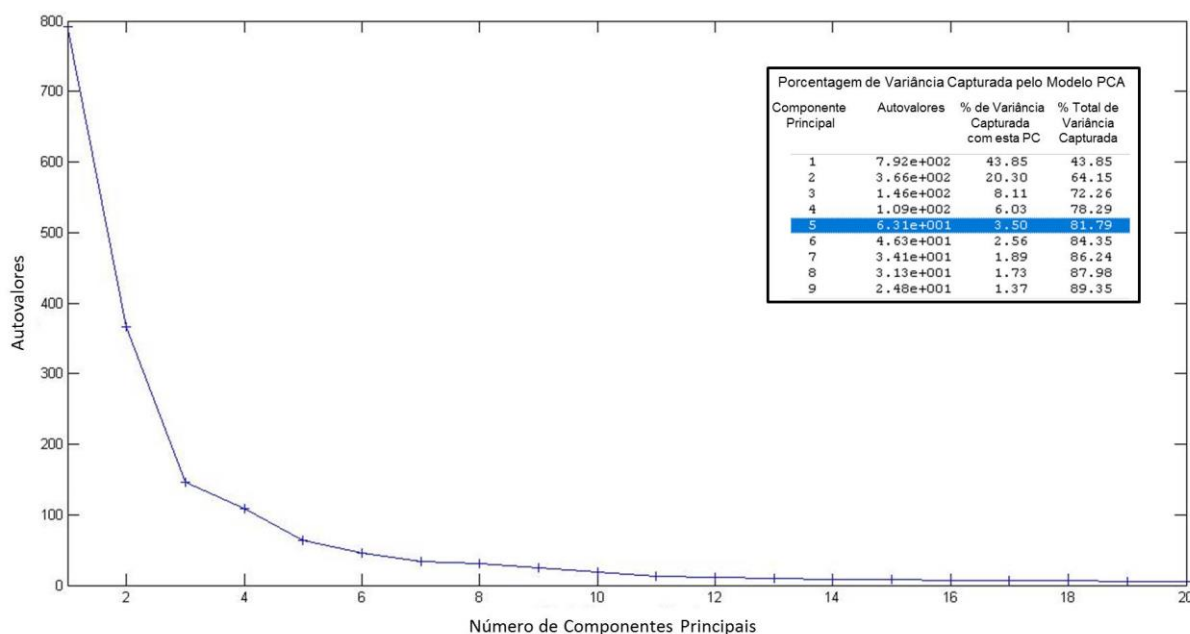
A identificação errônea desses exemplares tem dificultado os estudos químicos, onde metabólitos podem estar sendo relatados em espécies identificadas erroneamente.

5.3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. myriocephala* NO MIR

Os espectros obtidos na região MIR das amostras de 36 *B. trimera*, 29 *B. articulata*, 11 *B. junciformis*, 14 *B. milleflora*, e 16 *B. myriocephala* foram organizados em matriz, apresentando 106 linhas e 1805 colunas.

Definido o pré-processamento, o número de PC utilizado na PCA foi escolhido pelo gráfico de autovalores *versus* número de PCs (Figura 29). Para esta análise foi escolhido as 5 primeiras componentes principais, em que resultou um acúmulo de variância explicado de 81,79% dos dados originais.

FIGURA 29 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

Determinado o número de PC, o gráfico de *scores* foi construído de modo a verificar a discriminação entre as cinco espécies de *Baccharis*. Para a discriminação

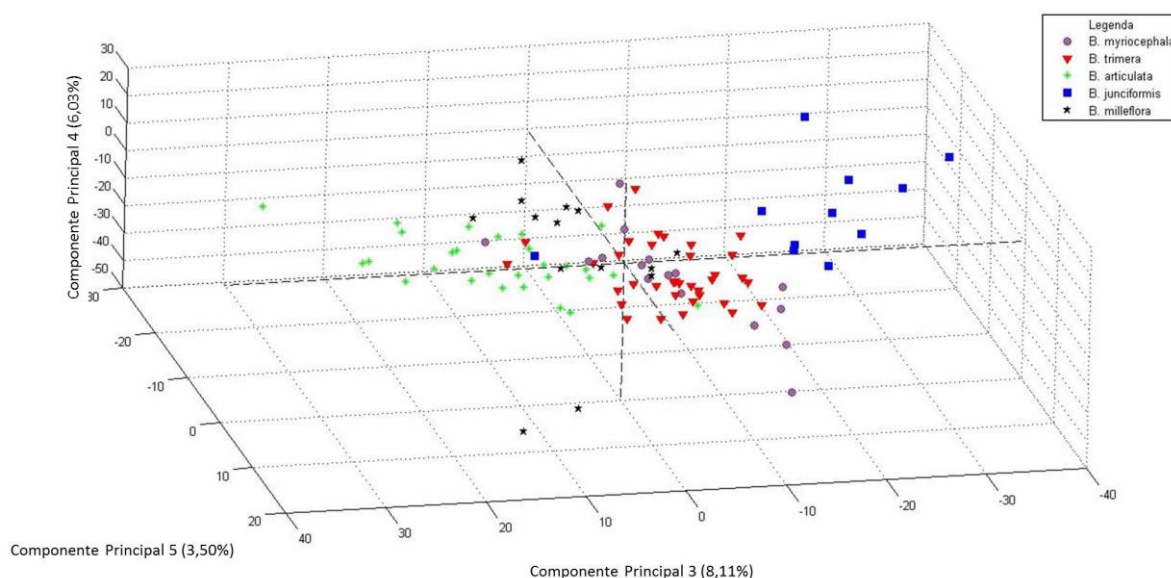
entre as 5 espécies o uso de 2 PCs não foi suficiente, dessa forma para a construção do gráfico de scores foi necessário a utilização de 3 PCs (PC3 X PC4 X PC5), gerando um gráfico tridimensional (Figura 30). A PC3 apresentou 8,11 % da variância explicada, PC4 apresentou 6,03% da variância explicada, e PC5 apresentou 3,50% da variância explicada. A somatória das 3 PCs resultou em um acúmulo de 17,64% da variância explicada dos dados originais.

Conforme o gráfico de scores, a PC3 apresentou em seu lado positivo as amostras de *B. articulata* e de *B. milleflora*, e em seu lado negativo ficaram localizadas amostras de *B. junciformis*, de *B. trimera* e de *B. myriocephala*.

Nesse sentido, a PC4 contribuiu na separação das amostras de *B. trimera* (localizadas ao lado positivo) das amostras de espécies de *B. junciformis*, *B. articulata*.

A contribuição da PC5 por sua vez foi fundamental na separação das amostras de *B. junciformis* (ao lado negativo de PC5) das demais amostras, principalmente de *B. trimera*, que se apresentou ao lado positivo dessa PC.

FIGURA 30 – GRÁFICO DE SCORES DE PC3 VERSUS PC4 VERSUS PC5 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NA REGIÃO MIR



FONTE: O Autor (2016).

Como todas as PCs contribuíram para a discriminação entre as espécies, o gráfico de *loadings* de PC3, PC4 e PC5 foi construído de modo a determinar os números de ondas responsáveis pela separação entre as espécies (Figura 31).

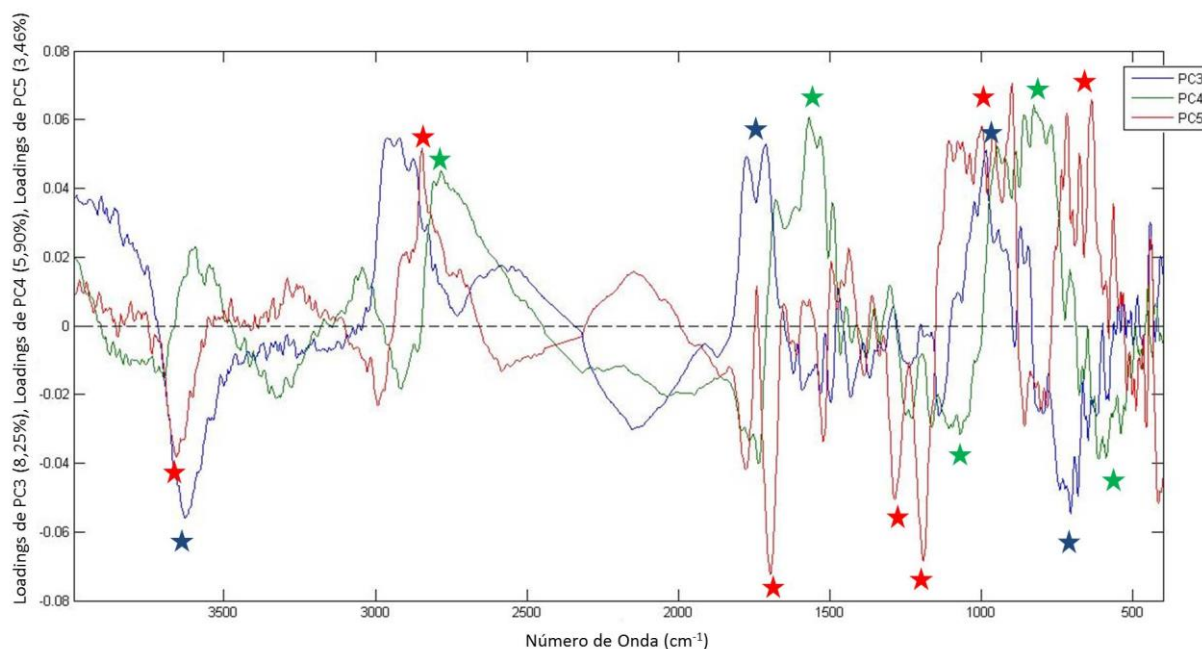
Os números de ondas que contribuíram para a discriminação das amostras de *B. trimera* e de *B. myriocephala* foram os presentes nas regiões ao lado negativo de *loadings* de PC3, ao lado positivo de PC4 e ao lado positivo de PC5. Essas regiões, de acordo com o gráfico de *loadings*, correspondem as seguintes bandas: estiramento de OH, estiramento de OH de ácidos carboxílicos, estiramento de C=C de anéis aromáticos; e bandas de deformação fora do plano de C-H de anéis aromáticos.

Para as amostras de *B. articulata*, os números de ondas responsáveis pela discriminação dessas amostras estão nas regiões negativas de *loadings* de PC3 e negativas de *loadings* de PC5. Essas regiões apresentam bandas referentes a estiramento de OH, estiramento assimétrico e simétrico de CH₂ e CH₃, estiramento de C=O e estiramento de C-O.

As variáveis responsáveis pela discriminação das amostras de *B. junciformis* são as presentes ao lado negativo de *loadings* de PC3 e ao lado negativo de PC5. Essas regiões apresentam bandas de estiramento de OH, de deformação fora do plano de C-H de anéis aromáticos, estiramento de C=O e estiramento de C-O.

Para a discriminação de amostras de *B. milleflora*, as variáveis que contribuíram nessa separação foram as localizadas nas regiões ao lado negativo de *loadings* de PC3 e ao lado positivo de *loadings* de PC4. Tais regiões apresentam bandas de estiramento de OH, de estiramento de OH de ácido carboxílico, e de estiramento de C=C de anel aromático.

FIGURA 31 – GRÁFICO DE LOADINGS DE PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NA REGIÃO MIR



FONTE: O Autor (2016).

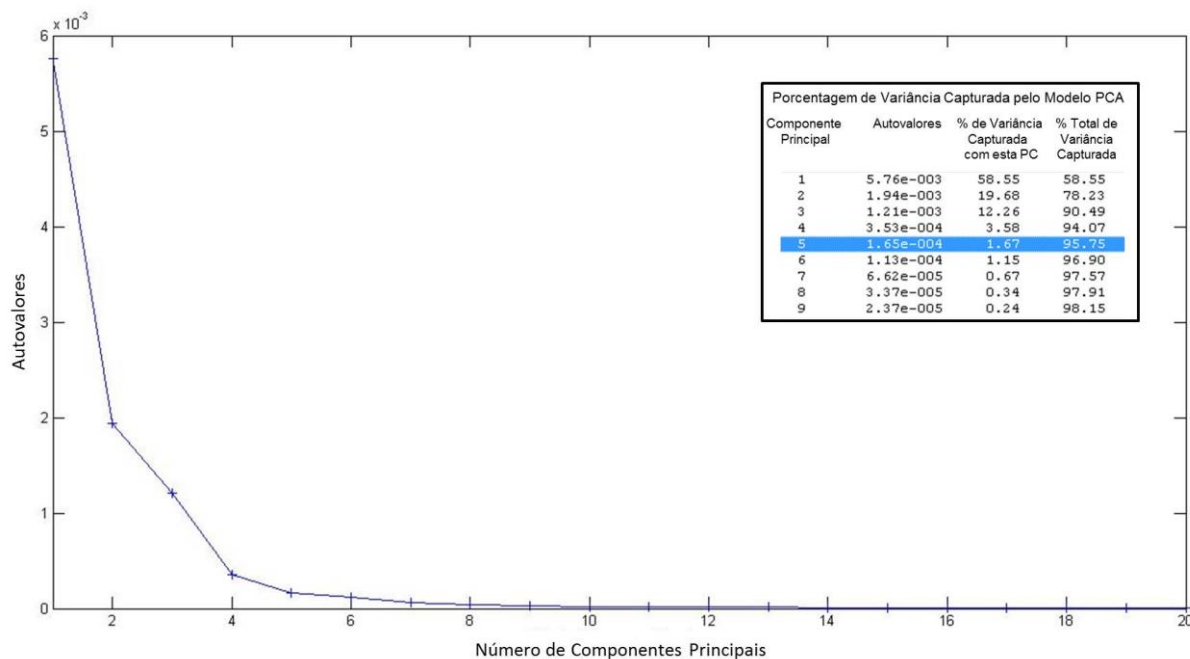
Conforme as discriminações obtidas entre a espécie *B. trimera* com as demais, a PCA de todas as espécies simultaneamente, demonstrou que os grupos funcionais responsáveis pela discriminação, possivelmente são os presentes em compostos da classe dos ácidos fenólicos e flavonoides. Além disso, o resultado da PCA de todas as amostras simultaneamente demonstrou a possibilidade de se desenvolver modelos de classificação utilizando dados espectrais na região MIR, pois foi possível obter a discriminação entre as amostras nessa região.

5.3.6 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NO NIR

Os espectros obtidos na região NIR das amostras pulverizadas de 36 *B. trimera* e 29 *B. articulata* foram organizado em matriz, com 65 linhas e 419 colunas.

A determinação do número de PCs utilizado na PCA foi realizada através do gráfico de autovalores *versus* número de PCs (Figura 32). Analisando o gráfico é possível verificar que um número de PCs superiores a 5 não apresentaram acúmulo significativo da variância, desta forma para esta análise utilizou-se as 5 primeiras, obtendo 93,09% da variância explicada.

FIGURA 32 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NA REGIÃO NIR

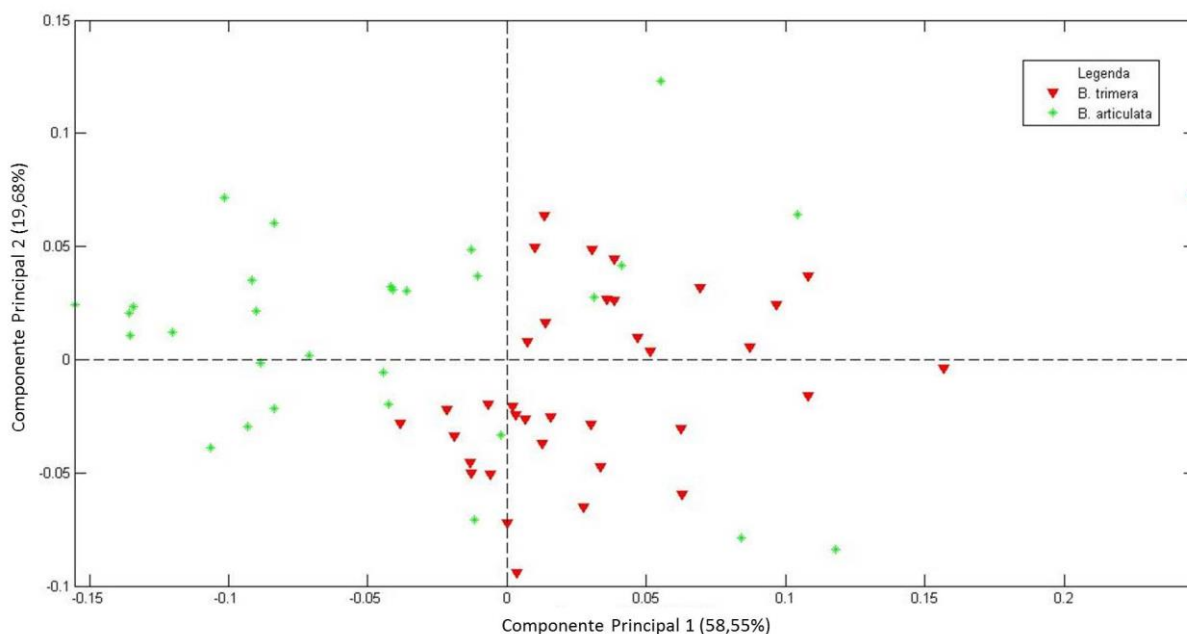


FONTE: O autor (2016).

Para avaliar a discriminação entre as amostras e determinar as PCs responsáveis pela discriminação, o gráfico de *scores* foi construído. Na Figura 33 está representado o gráfico de *scores* formado por PC1 *versus* PC2, apresentando 58,55% e 19,68%, respectivamente da variância explicada. A soma dessas PCs resultou em 78,23% da variância explicada dos dados originais.

Através do gráfico de *scores* foi obtida a discriminação entre as espécies. A maioria das amostras de *B. trimera* localizou-se ao lado positivo de PC1, e as amostras de *B. articulata* localizaram-se em sua maioria ao lado negativo de PC1.

FIGURA 33 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC2 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NA REGIÃO NIR

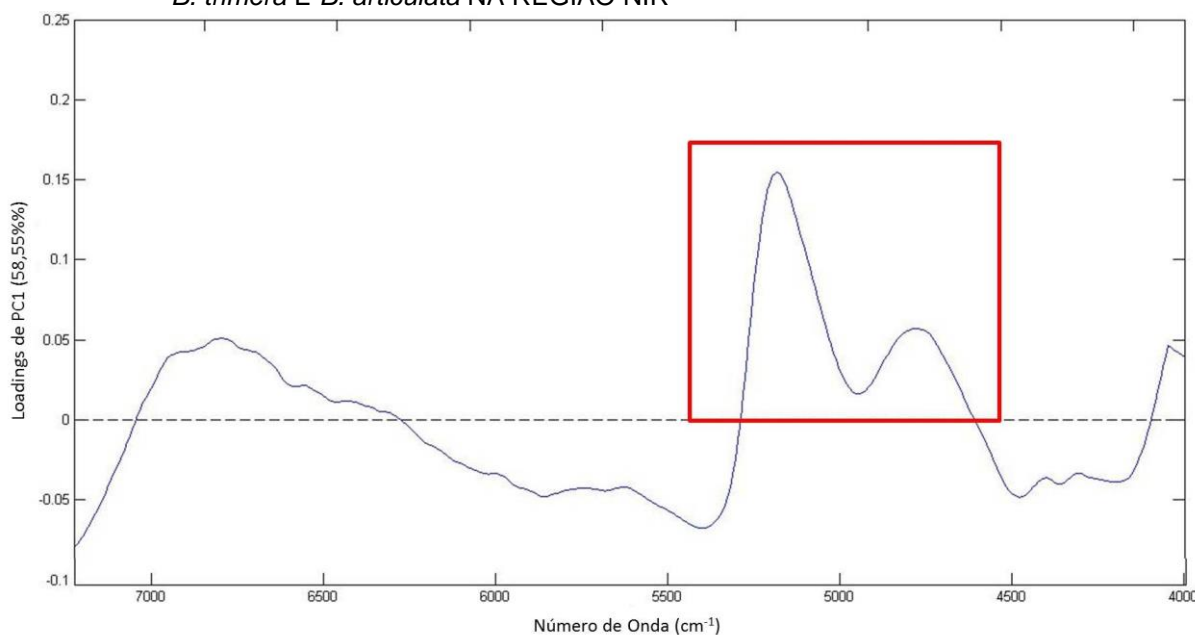


FONTE: O autor (2016).

Como apresentado anteriormente, a PC 1 foi a responsável pela discriminação entre as amostras. Portanto, para determinar as variáveis responsáveis pela discriminação, o gráfico de *loadings* de PC1 foi avaliado.

O gráfico de *loadings* de PC1 (Figura 34) apresentou no lado positivo uma região em 5277 a 4628 cm^{-1} , correspondentes as bandas de combinação de OH e de segundo sobretom de C=O.

FIGURA 34 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC1 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. articulata* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

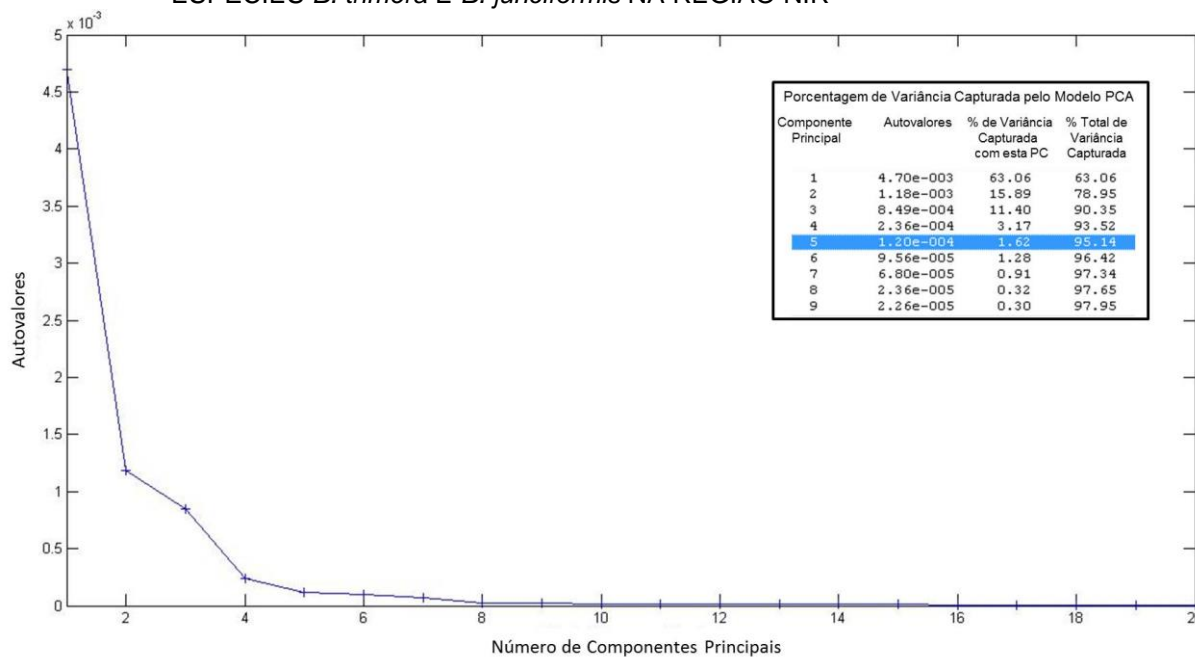
Conforme observado no gráfico de *loadings* de PC1, os principais grupos funcionais responsáveis pela discriminação entre as amostras, foram os grupos: OH e C=O. Tais grupos condizem com a PCA realizada na região MIR, que também na análise de *loadings* apresentou esses grupos funcionais, demonstrando que possivelmente os ácidos fenólicos são os compostos responsáveis pela discriminação entre as amostras de *B. trimera* e *B. articulata*.

5.3.7 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NO NIR

Na análise de PCA os espectros no NIR das amostras de 36 *B. trimera* e 10 *B. junciformis* foram organizados em matriz, composta por 46 linhas e por 419 colunas.

Conforme o gráfico autovalores *versus* número de componentes principais (Figura 35), número de PCs acima de 5 não resultou em aumento significativo da variância explicada, dessa forma as 5 primeiras PCs foram escolhidas para compor a PCA, onde resultou um acúmulo de 95,14% da variância explicada.

FIGURA 35 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NA REGIÃO NIR

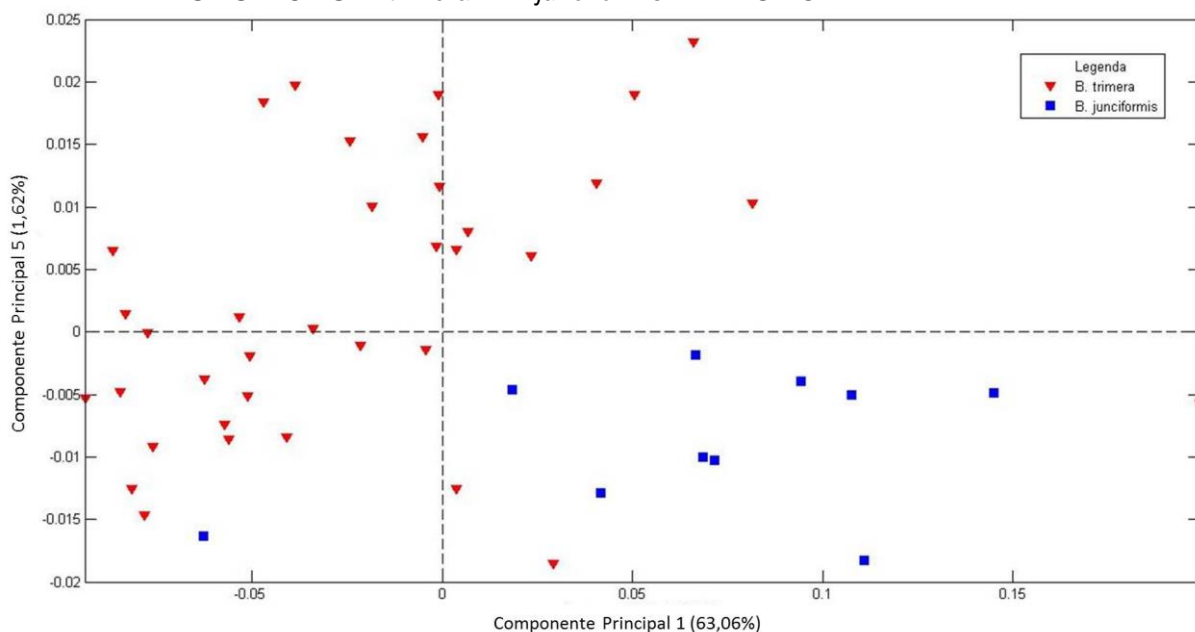


FONTE: O autor (2016).

Para a construção do gráfico de *scores* foram utilizadas a PC1 e a PC5 (Figura 36), onde a PC1 explicou 63,06% da variância e a PC5 explicou 1,62% da variância, onde a somatória dessas PCs resultou em 64,68% da variância explicada.

O gráfico de *scores* demonstrou a discriminação entre as duas espécies, onde amostras de *B. trimera* apresentaram-se em sua maioria ao lado negativo de PC1 e as amostras de *B. junciformis* localizaram-se no quadrante localizado no lado positivo de PC1 e negativo de PC5.

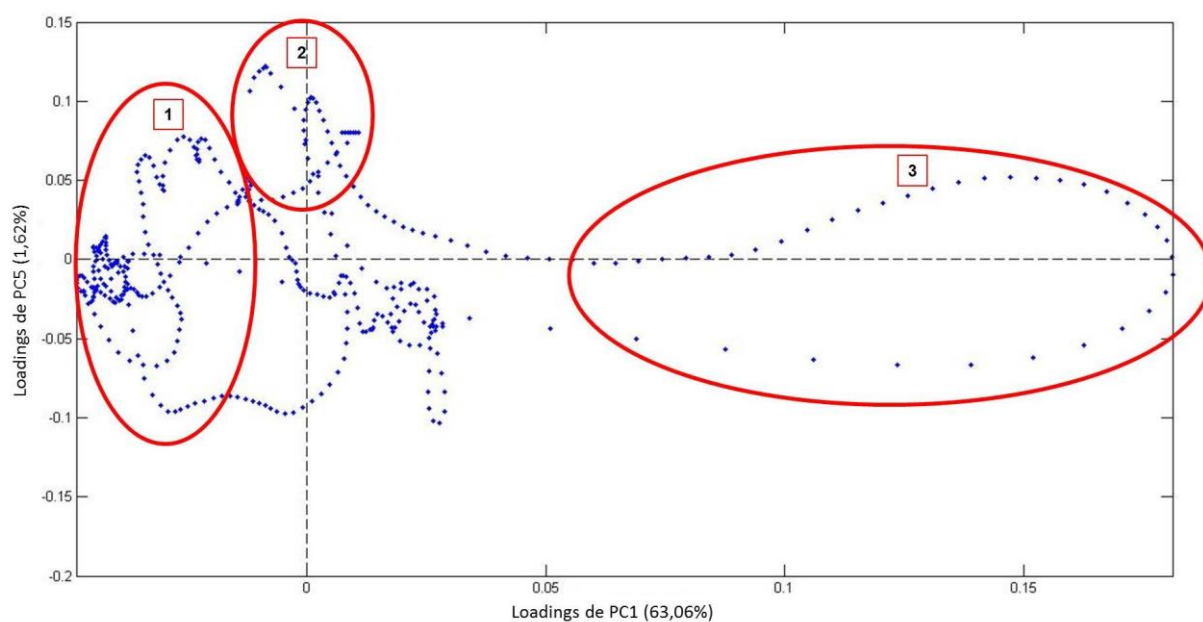
FIGURA 36 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC5 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

As análises dos pesos das variáveis na discriminação entre as amostras ocorreram através do gráfico de *loadings* de PC1 versus PC5 (Figura 37). O gráfico de *loadings* apresentou 3 regiões principais na separação entre as amostras, essas foram: região 1 – 4166 a 4112 cm^{-1} correspondente a banda de combinação de CH, e 6503 a 6063 cm^{-1} correspondente a banda de primeiro sobretom de OH; região 2 – 4451 a 4181 cm^{-1} onde está presente a banda de combinação de CH, e 6025 a 5331 cm^{-1} correspondente a banda do primeiro sobretom de OH; e região 3 - 7120 a 6588 cm^{-1} em que apresentam bandas do primeiro sobretom de OH.

FIGURA 37 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC1 *VERSUS* PC5 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. junciformis* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

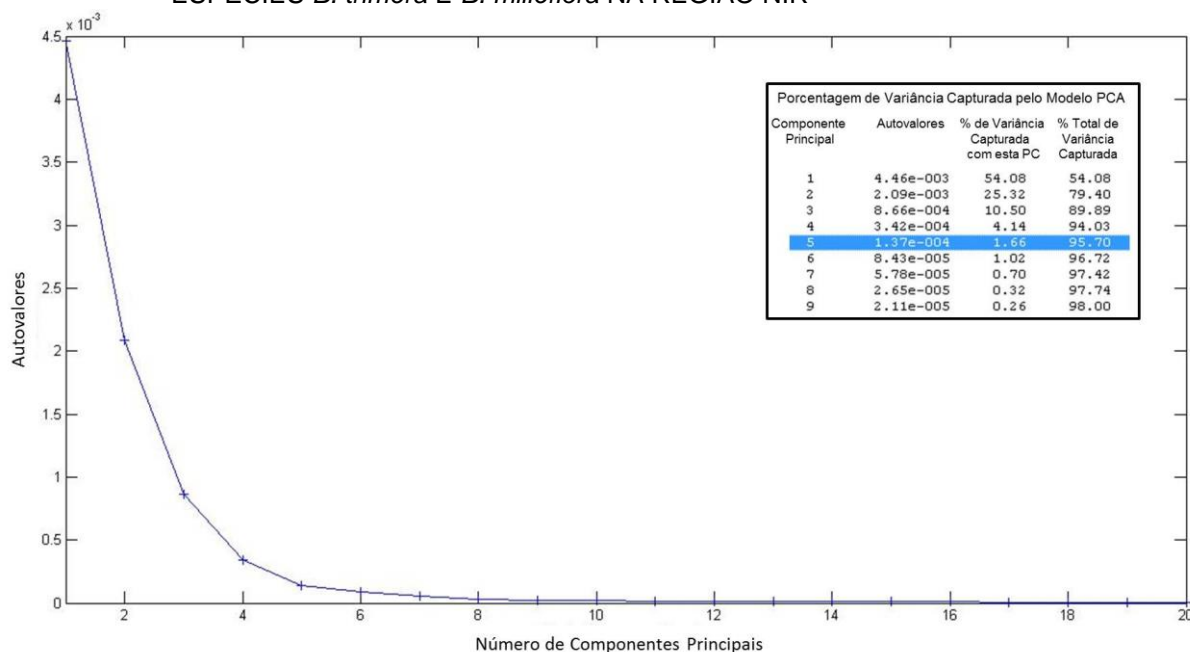
O gráfico *loadings* demonstrou que os grupos funcionais CH e OH foram responsáveis pelo agrupamento das amostras de *B. trimera*; e o agrupamento OH, o responsável pelo agrupamento das amostras de *B. junciformis*. Tais grupos podem estar relacionados aos ácidos fenólicos, compostos comumente identificados em ambas às espécies.

5.3.8 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NO NIR

Na PCA das amostras de 36 *B. trimera* e 14 *B. milleflora*, os dados espectrais foram organizados em matriz, gerando uma matriz compostas por 50 linhas e 419 colunas.

Conforme o gráfico de autovalores *versus* número de PCs (Figura 38), foram escolhidas 5 PCs para a PCA, em que resultou um acúmulo de 95,70% da variância explicada dos dados originais.

FIGURA 38 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NA REGIÃO NIR

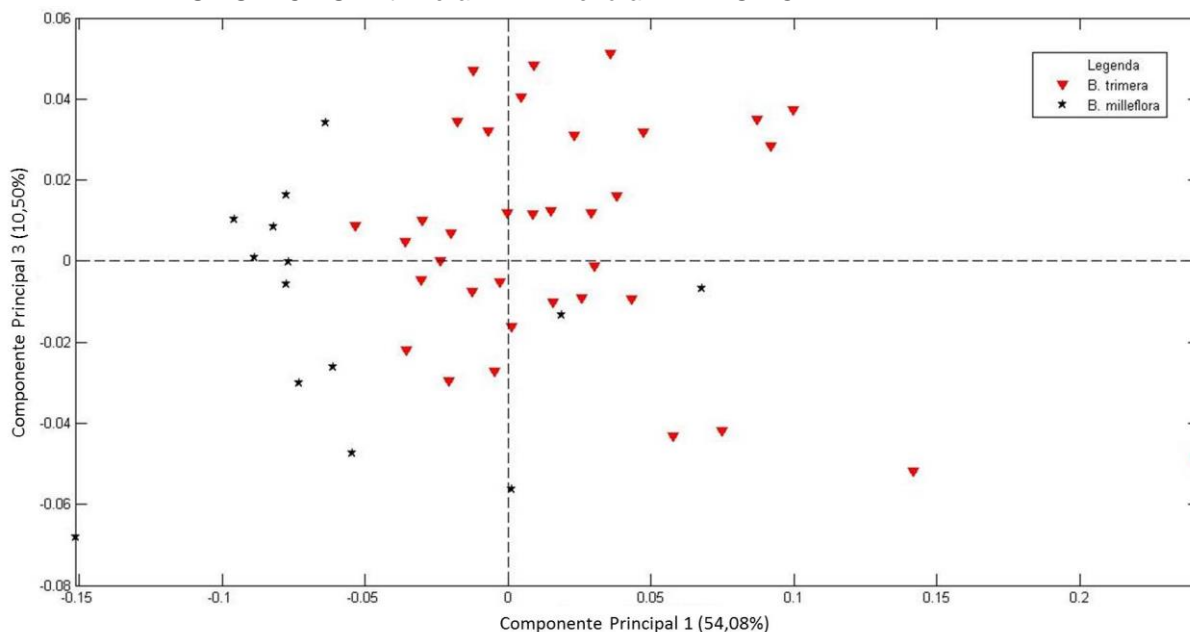


FONTE: O autor (2016).

Para a construção do gráfico de *scores* utilizou as PC1 e PC3, onde a PC1 foi responsável por 54,08% da variância explicada, enquanto que a PC3 foi responsável por 10,50% da variância explicada. Em conjunto essas duas PCs apresentaram 64,58% da variância explicada dos dados originais.

O gráfico de *scores* (Figura 39) demonstrou a discriminação entre as amostras. Onde amostras de *B. trimera* apresentaram-se em sua maioria ao lado positivo de PC1, porém com algumas ao lado negativo de PC1. As amostras de *B. milleflora* por sua vez ficaram ao lado negativo de PC1, sendo que a separação entre as espécies foi determinada pelos maiores valores de *scores* negativos em PC1 apresentados pelas amostras de *B. milleflora*.

FIGURA 39 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NA REGIÃO NIR

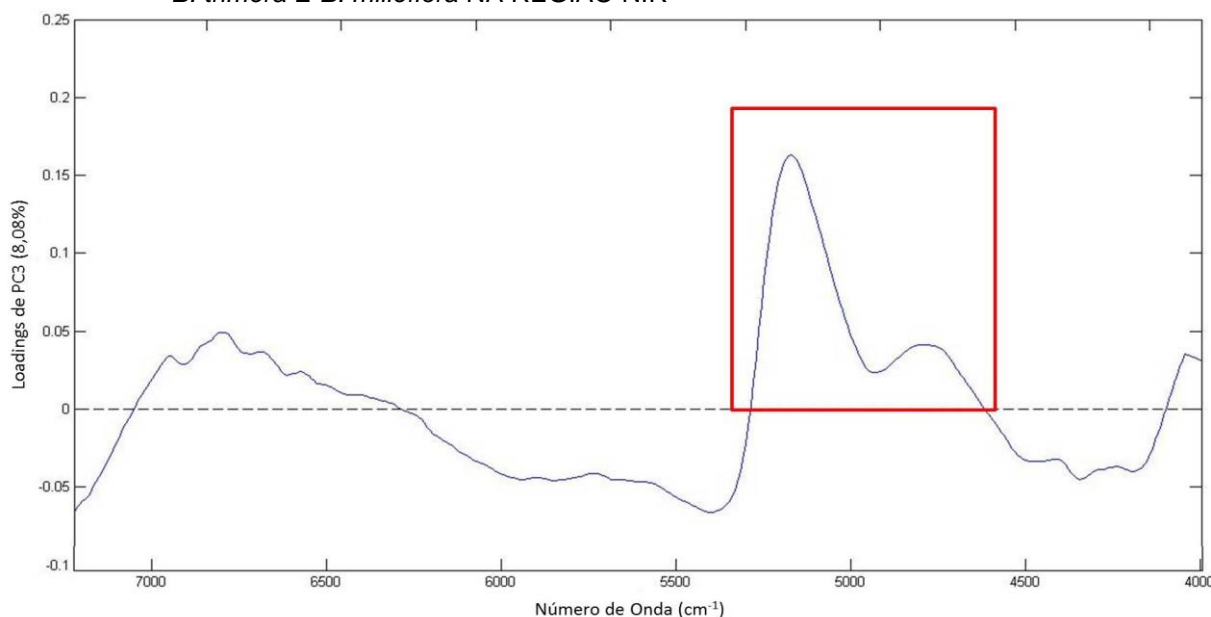


FONTE: O autor (2016).

Como verificado anteriormente, a PC1 foi a principal responsável pela discriminação entre as espécies. Desse modo para a verificação dos pesos das variáveis, o gráfico de *loadings* de PC1 foi analisado.

O gráfico de *loadings* de PC1 (Figura 40) apresentou ao lado positivo uma região em 5277 a 4636 cm^{-1} , que corresponde às bandas de combinação de OH e de segundo sobretom de C=O.

FIGURA 40 – GRÁFICO DE LOADINGS DE PC1 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. milleflora* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

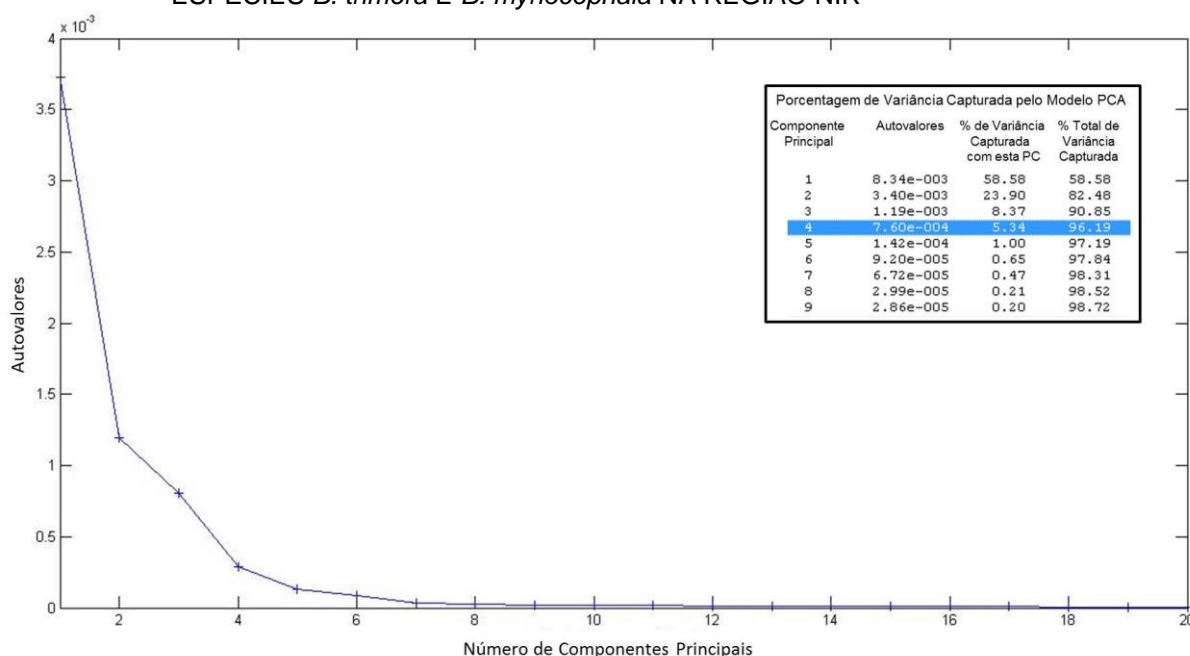
Conforme o gráfico de *loadings*, dois grupos funcionais foram os principais responsáveis pela discriminação entre as amostras, esses são: C=O e OH. Esses também foram encontrados na análise de *loadings* de PCA na região MIR. Possivelmente tais grupos estão relacionados com a presença de ácidos fenólicos encontrados em exemplares de *B. trimera*.

5.3.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NO NIR

Para a PCA, os dados espectrais da região NIR das amostras de 36 *B. trimera* e 16 *B. myriocephala* foram organizados em matriz, com 52 linhas e 419 colunas.

Através do gráfico de autovalores *versus* número de PCs (Figura 41), as 4 primeiras PCs foram escolhidas para comporem a PCA, onde se obteve 96,16% do acúmulo de variância explicada.

FIGURA 41 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NA REGIÃO NIR

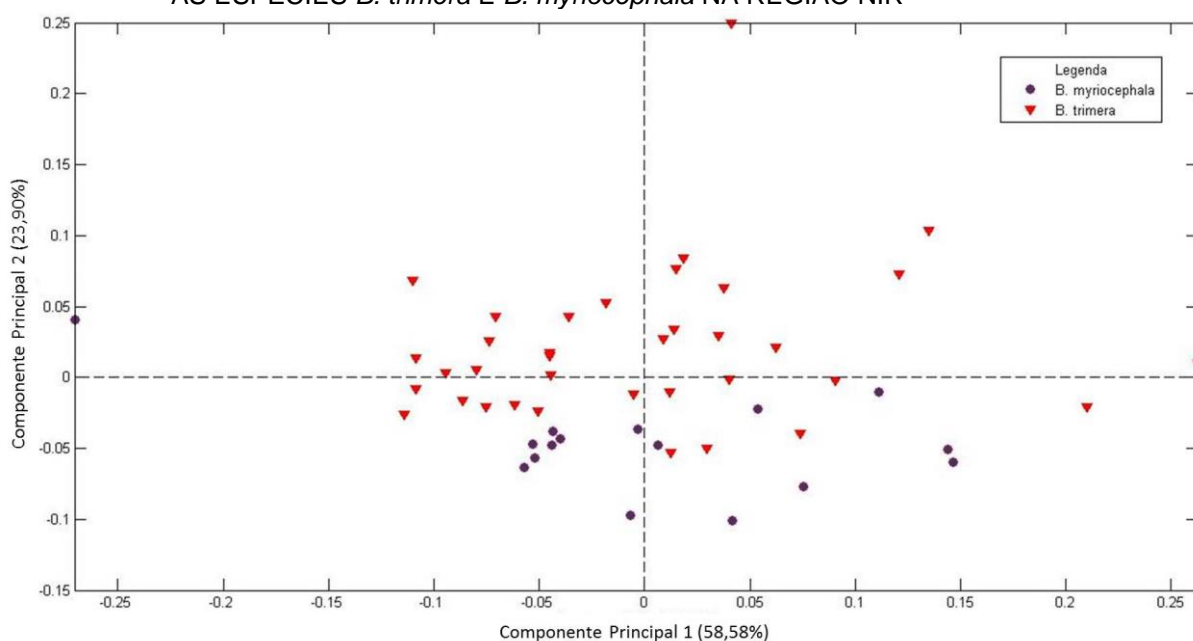


FONTE: O autor (2016).

O gráfico de *scores* foi construído utilizando a PC1 e a PC2, onde a PC1 explicou 58,58% da variância e a PC2 explicou 23,90% da variância. A soma dessas PCs resultou em 82,48% da variância explicada dos dados originais.

Através do gráfico de *scores* (Figura 42) foi obtida uma discriminação parcial entre as amostras. A maioria das amostras de *B. trimera* se localizou principalmente ao lado positivo de PC2, entretanto algumas amostras localizaram ao lado negativo dessa PC. As amostras de *B. myriocephala* se localizaram ao lado negativo de PC2.

FIGURA 42 – GRÁFICO DE *SCORES* DE PC1 VERSUS PC2 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NA REGIÃO NIR

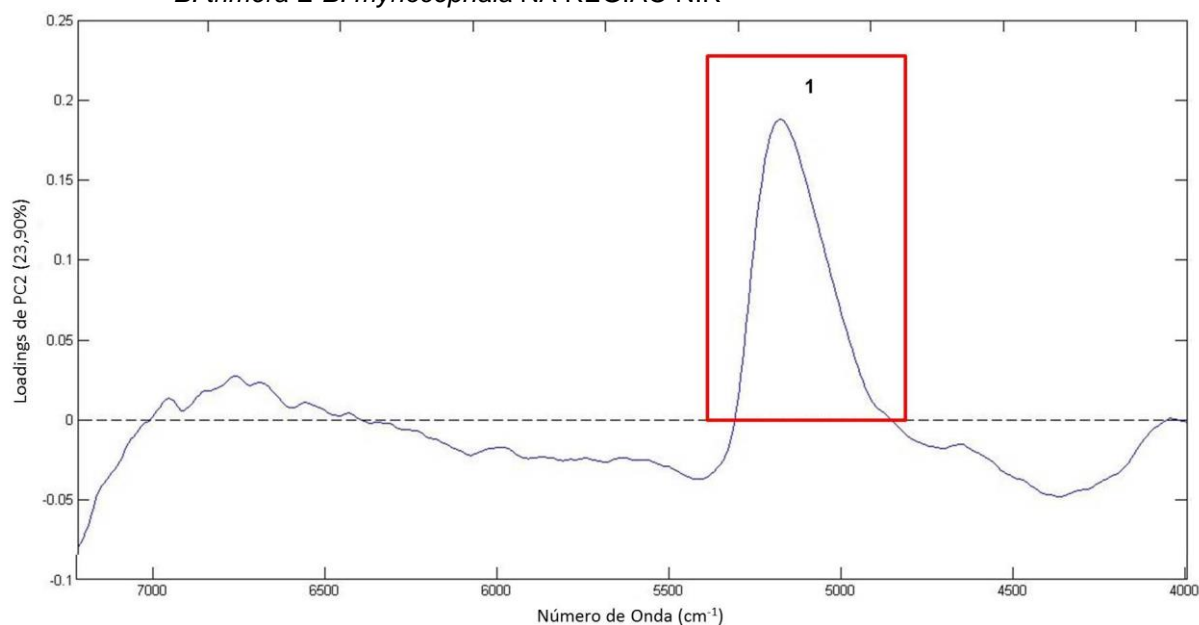


FONTE: O Autor (2016).

Como apresentado anteriormente, a PC2 foi a responsável pela discriminação parcial entre as amostras, por esse motivo para a análise dos pesos das variáveis foi construído o gráfico de *loadings* de PC2.

A análise do gráfico de *loadings* de PC2 (Figura 43) apresentou ao lado positivo uma região em 5307 a 4868 cm^{-1} , em que estão presentes bandas de segundo sobretom de C=O.

FIGURA 43 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC2 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera* E *B. myriocephala* NA REGIÃO NIR



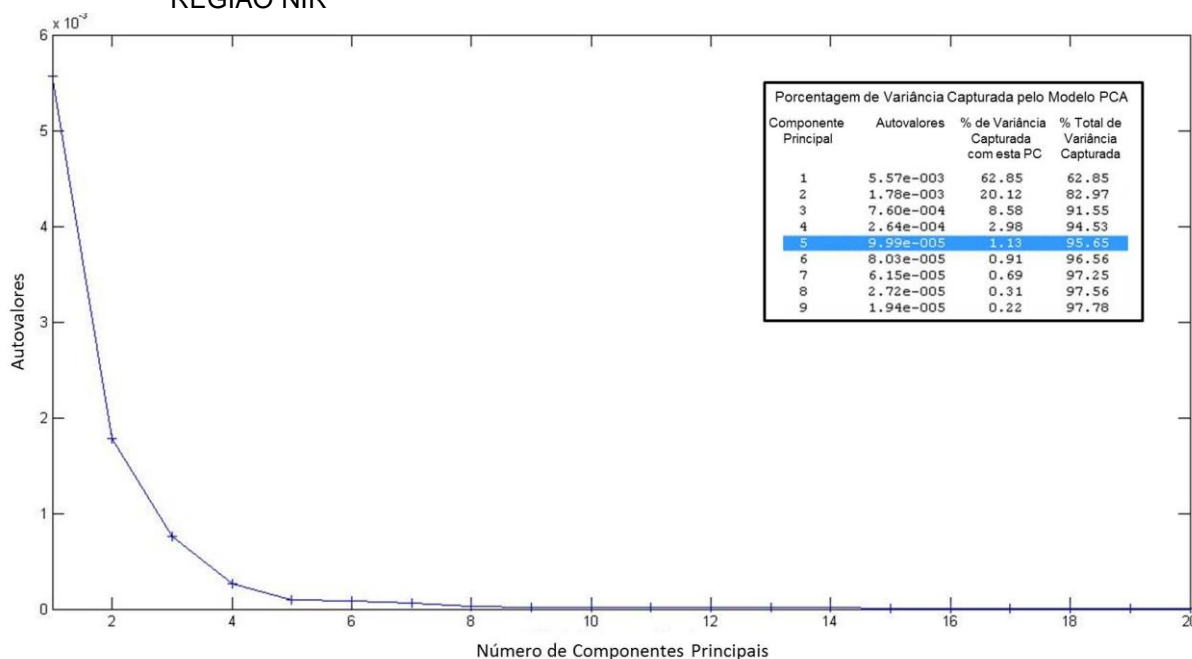
FONTE: O autor (2016).

5.3.10 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NO NIR.

Os dados espectrais obtidos na região NIR das amostras de 36 *B. trimera*, 29 *B. articulata*, 11 *B. junciformis*, 14 *B. milleflora*, e 16 *B. myriocephala* foram organizados em matriz, apresentando 106 linhas e 419 colunas.

O gráfico de autovalores *versus* número de PCs (Figura 44) foi construído para a escolha do número de PCs. Conforme demonstrado no gráfico, valores superiores a 5 PCs não contribuíram significativamente com o acúmulo de variância explicada, portanto as 5 primeiras PCs foram utilizadas na PCA, resultando em 95,65% da variância explicada dos dados originais.

FIGURA 44 – GRÁFICO DE AUTOVALORES *VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE PC NA DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NA REGIÃO NIR

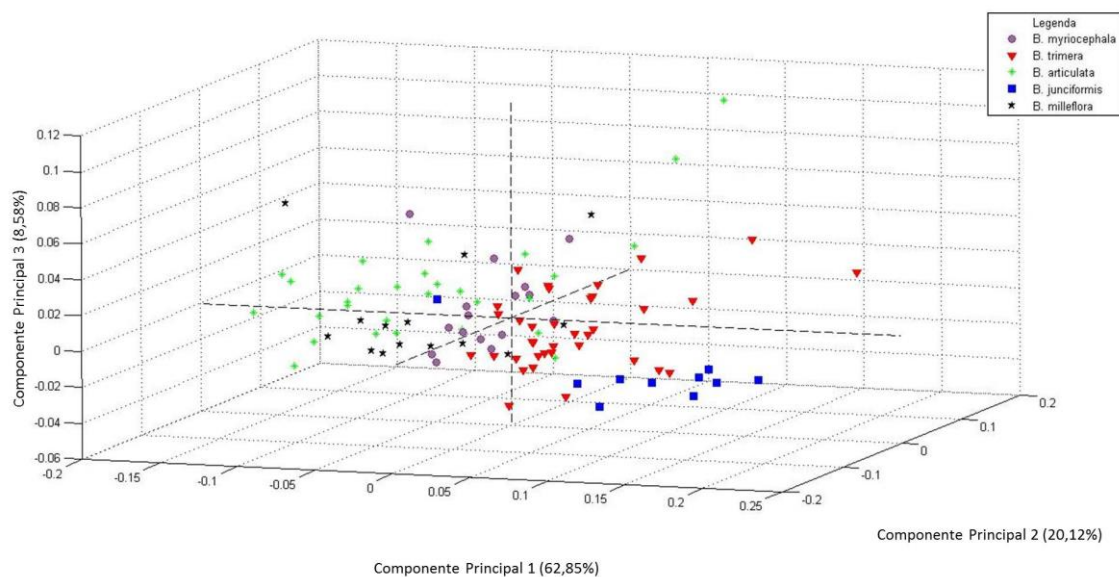


FONTE: O autor (2016).

O gráfico de *scores* (Figura 45) foi composto pelas PC1, PC2 e PC3 que apresentaram 62,85%, 20,12% e 8,58%, respectivamente da variância explicada. O conjunto dessas PCs resultou em 91,55% da variância explicada dos dados originais.

O gráfico de *scores* demonstrou que a PC1 foi responsável pela separação entre as amostras de *B. trimera* e *B. junciformis*, localizadas no lado positivo, e das espécies *B. myriocephala*, *B. articulata* e *B. milleflora*, localizadas no lado negativo. Por sua vez, a PC2 foi responsável pela separação entre as amostras de *B. junciformis* e *B. milleflora* (localizadas ao lado negativo) das demais amostras. Nesse sentido a PC3 foi responsável pela separação entre as amostras *B. articulata*, localizadas ao lado negativo dessa PC, das amostras de *B. trimera* e *B. junciformis*.

FIGURA 45 – GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC2 VERSUS PC3 OBTIDO NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

Como demonstrado no gráfico de *scores*, as 3 PCs contribuíram para a discriminação entre as amostras das 5 espécies, desse modo para determinar as variáveis responsáveis pela discriminação foram construídos o gráfico de *loadings* com as PC1, PC2 e PC3 (Figura 46).

Para a discriminação das amostras de *B. trimera*, os números de ondas responsáveis foram os presentes nas regiões ao lado positivo de *loadings* de PC1 e ao lado negativo de *loadings* de PC3. Tais regiões são correspondentes a bandas de grupos de OH e C=O.

Para as amostras de *B. articulata*, as regiões responsáveis pela discriminação dessas amostras foram as localizadas ao lado positivo de *loadings* de PC3. Essas regiões são correspondentes às bandas de grupo CH.

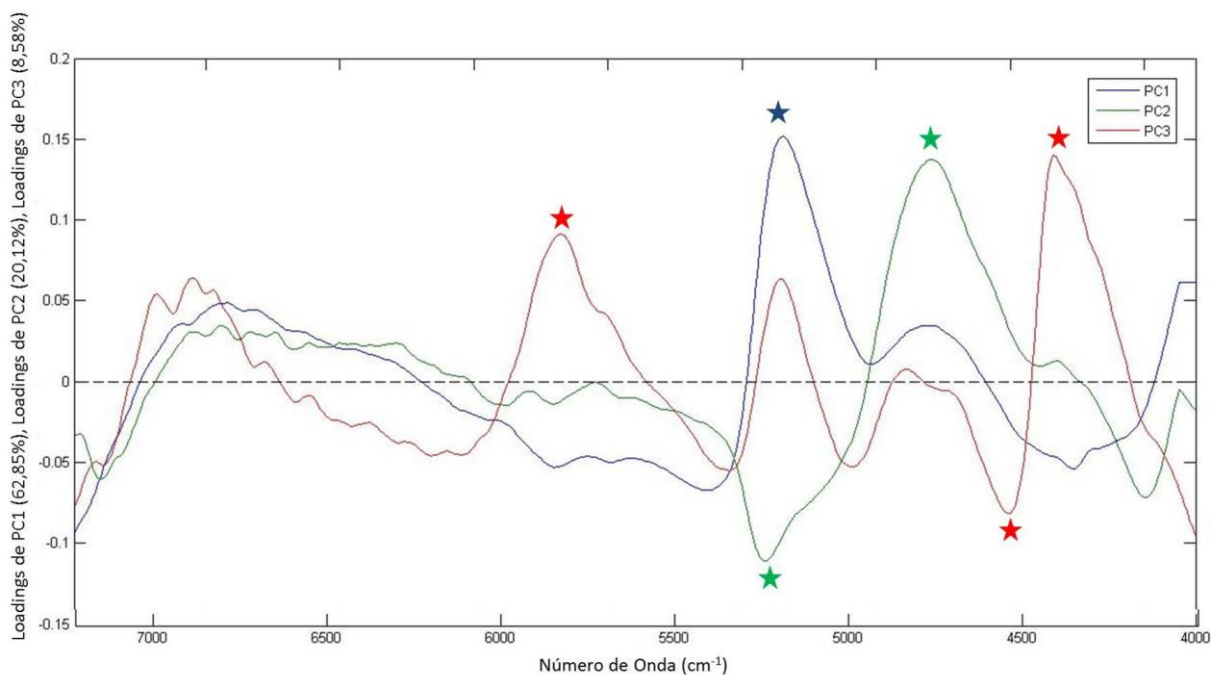
As regiões que contribuíram para a separação das amostras de *B. junciformis* foram as presentes ao lado positivo de *loadings* de PC1 e negativo de *loadings* de PC3. Essas regiões são as referentes aos grupos de OH e C=O.

Para as amostras de *B. milleflora*, as regiões que contribuíram para a separação dessas foram as localizadas ao lado negativo de *loadings* de PC1 e ao lado negativo de *loadings* de PC2. Essas regiões são referentes às bandas de C=O.

Na discriminação das amostras de *B. myriocephala*, as regiões responsáveis pela separação foram as localizadas ao lado negativo de *loadings* de PC1 e ao lado

negativo de *loadings* de PC3. Essas regiões foram referentes a bandas de grupo CH.

FIGURA 46 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC1, PC2 E PC3 DA ANÁLISE POR PCA ENTRE AS ESPÉCIES *B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

Através da análise do gráfico de *loadings* foi possível identificar os grupos funcionais responsáveis pela discriminação entre as amostras. Tais grupos foram condizentes com os resultados obtidos na PCA separadamente entre as espécies, onde o grupo OH e C=O foram os principais responsáveis pela discriminação entre as amostras de *B. trimera* das demais espécies.

5.4 ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA POR MINIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS-DA)

A construção de modelos de classificação por PLS-DA teve como objetivo correlacionar por regressão linear os dados instrumentais (dados espectrais de infravermelho) aos dados de classificação das amostras (espécies de *Baccharis*). Na PLS-DA para classificação das espécies de *Baccharis*, foram atribuídos valor de 1 para classe de interesse, e 0 para as demais classes.

Os modelos de classificação por PLS-DA foram construídos utilizando os espectros de MIR e de NIR das amostras pulverizadas de *Baccharis*. Sendo que 76% das amostras compuseram o conjunto de calibração e os restantes 24%, o conjunto de validação externa.

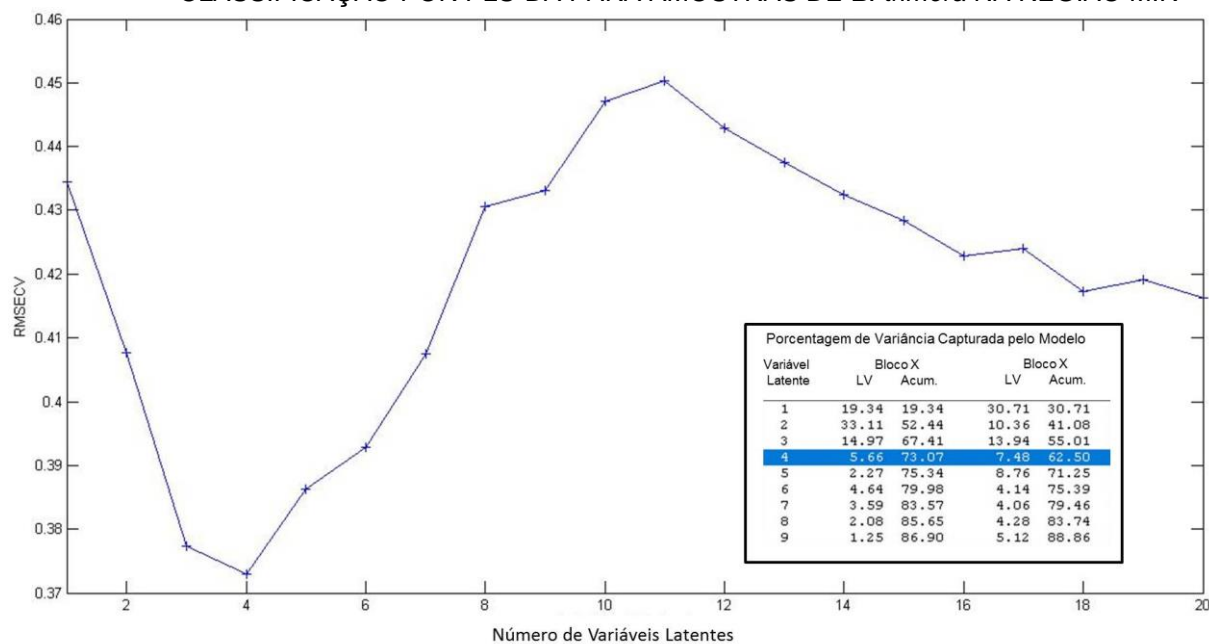
Os dados espectrais passaram por diversos tipos de pré-processamentos, de modo a obter o modelo mais eficiente na predição frente as amostras de validação externa. Para a validação cruzada foi utilizado o sistema *leave-one-out*.

5.4.1 MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO MIR

Para a construção do modelo por PLS-DA, os espectros de MIR do conjunto de calibração passaram por pré-processamento utilizando a combinação de autoescalamento e *detrend*.

A escolha do número de variáveis latentes (LVs) para compor o modelo foi realizada pelo gráfico da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) *versus* número de LVs. Onde o número escolhido de LVs foi o que apresentou o menor valor de RMSECV. Desse modo, para esse modelo foram utilizadas 4 LVs, que apresentou valor de RMSECV de 0,373 (Figura 47).

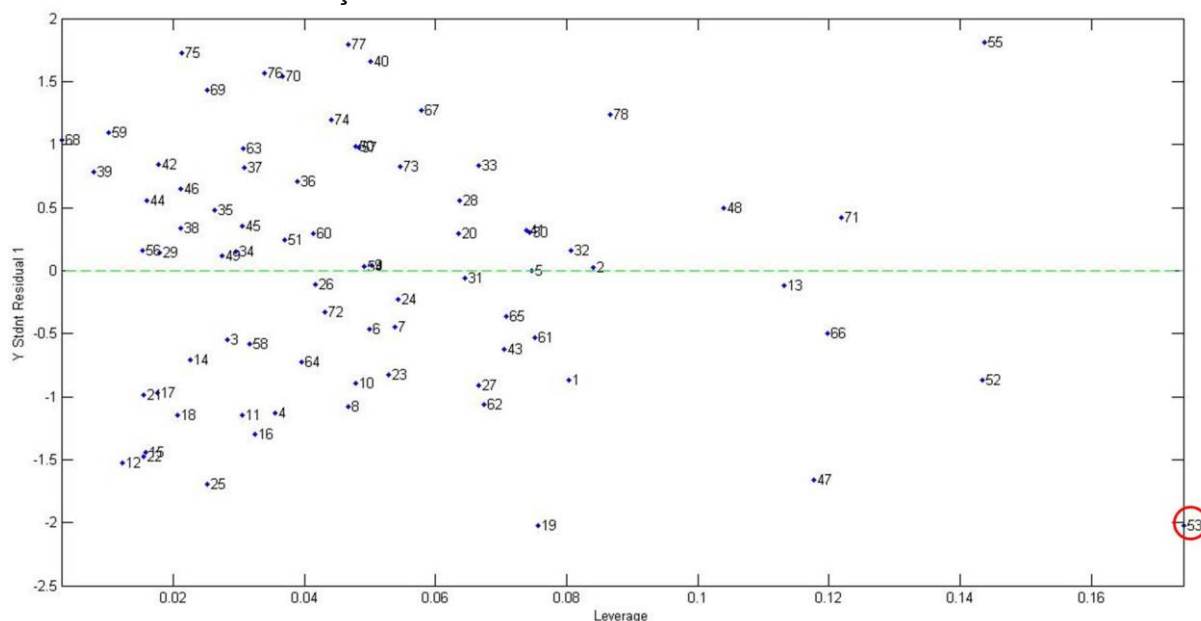
FIGURA 47 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE LV NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO MIR



FONTE: O Autor (2016).

Seguidamente foi plotado o gráfico de *leverage versus* resíduos de *Students* para a verificação de amostras anômalas. Nessa análise para a amostra ser considerada anômala, a mesma deve apresentar valor superior a 2,5 de resíduos de *Students* e ultrapassar valor limite de *leverage*. O limite de *leverage* é obtido multiplicando 3 vezes o número de LV e dividindo o resultado pelo número de amostras de calibração ($L = 3 \times LV/n$). Dessa maneira, conforme o gráfico de *leverage versus* resíduos de *Students* (Figura 48), somente uma amostra (amostra 53) ultrapassou limites de *leverage* ($L = 0,154$), porém a mesma apresentou baixos resíduos de *Students*.

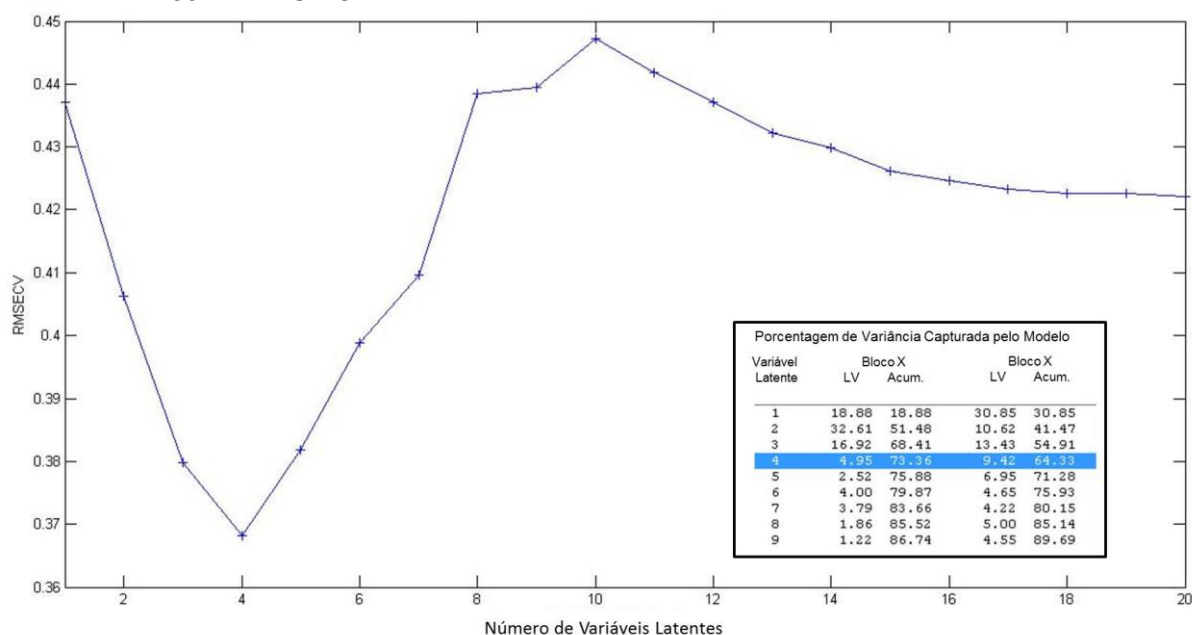
FIGURA 48 – GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE *STUDENTS* UTILIZADO PARA VERIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

Para verificar se a amostra 53 poderia estar influenciando o modelo negativamente, essa amostra foi retirada para melhor avaliação. Como demonstrado na Figura 49, com a retirada da amostra 53 não houve diminuição de número de LV (LV = 4) e nem a diminuição significativa de RMSECV (RMSECV = 0,368), dessa maneira a mesma foi mantida ao conjunto de calibração do modelo.

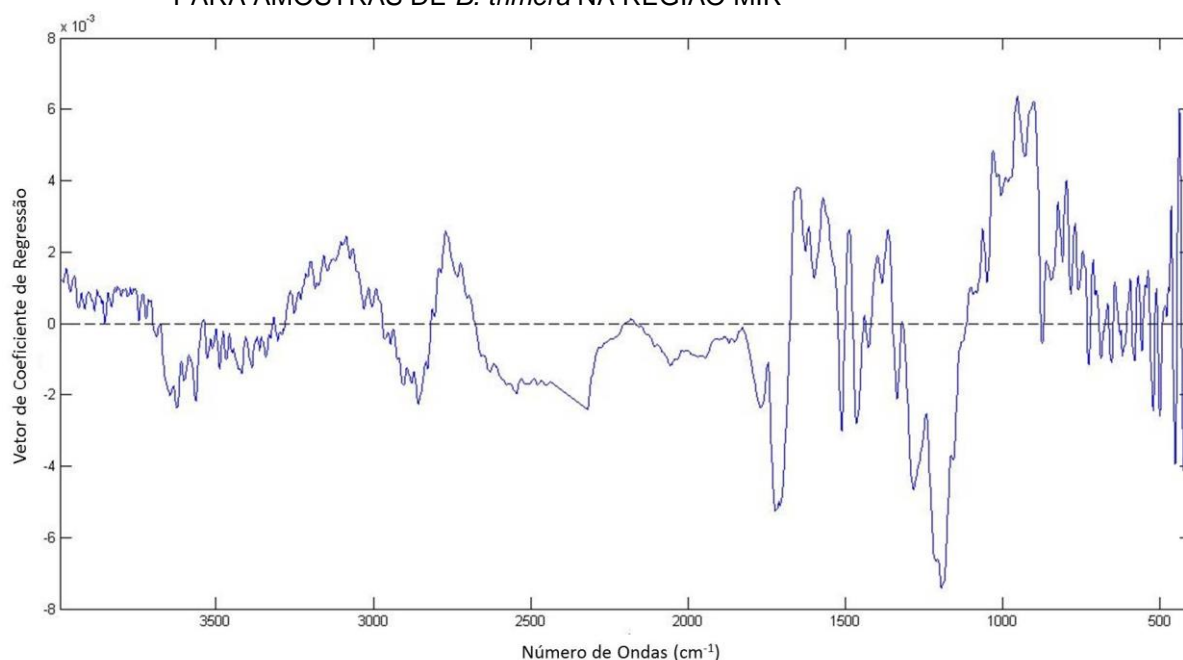
FIGURA 49 - GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE LV NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* SEM A AMOSTRA 53 NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

De modo a verificar as variáveis (número de onda) mais significativas na construção do modelo, o gráfico de vetor de coeficiente de regressão foi construído (Figura 50). As regiões do gráfico que apresentam maior relevância para a previsão do modelo são os números de ondas referentes a bandas de estiramento de OH de ácido carboxílico, de combinação de anel aromático, de estiramento de C=C de anel aromático e de estiramento de C-O.

FIGURA 50 – GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO MODELO PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO MIR



FONTE: O autor (2016).

Construído o modelo, a etapa seguinte foi à realização da validação externa, onde testou a capacidade de previsão do modelo utilizando as amostras que não participaram na construção do mesmo. Entre essas amostras estavam 9 amostras de *B. trimera* e 19 amostras das demais espécies de *Baccharis* (*B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. myriocephala*).

A tabela 3 apresentam as predições do modelo obtido pela validação externa. O modelo classificou corretamente 89% das amostras de *B. trimera* e 95% das amostras das demais espécies de *Baccharis*.

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DO MODELO PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO MIR

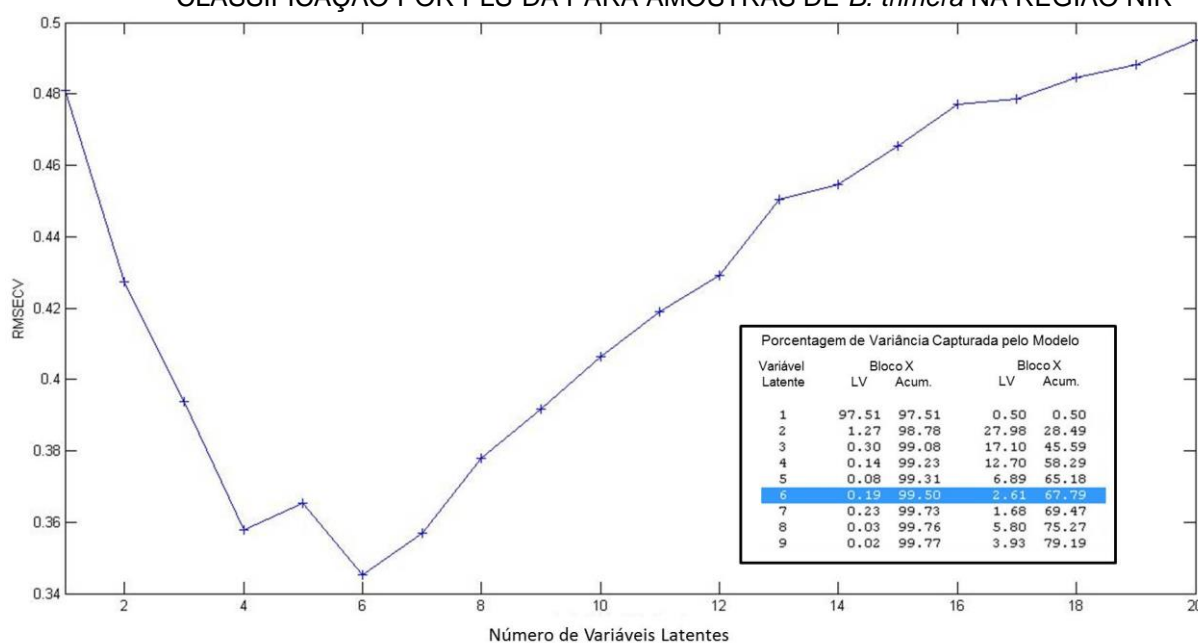
MODELO	AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> CLASSIFICADAS CORRETAMENTE	AMOSTRAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i> CLASSIFICADAS CORRETAMENTE
Modelo A	89%	95%

FONTE: O AUTOR (2016).

5.4.2 MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* REGIÃO NIR

Para a construção do modelo, os espectros NIR passaram por pré-processamento utilizando a combinação de SNV e 1ª derivada. Em seguida realizou a análise do gráfico de RMSECV *versus* número de LVs (Figura 50), onde foram escolhidas 6 LVs para compor o modelo, que apresentou RMSECV de 0,345.

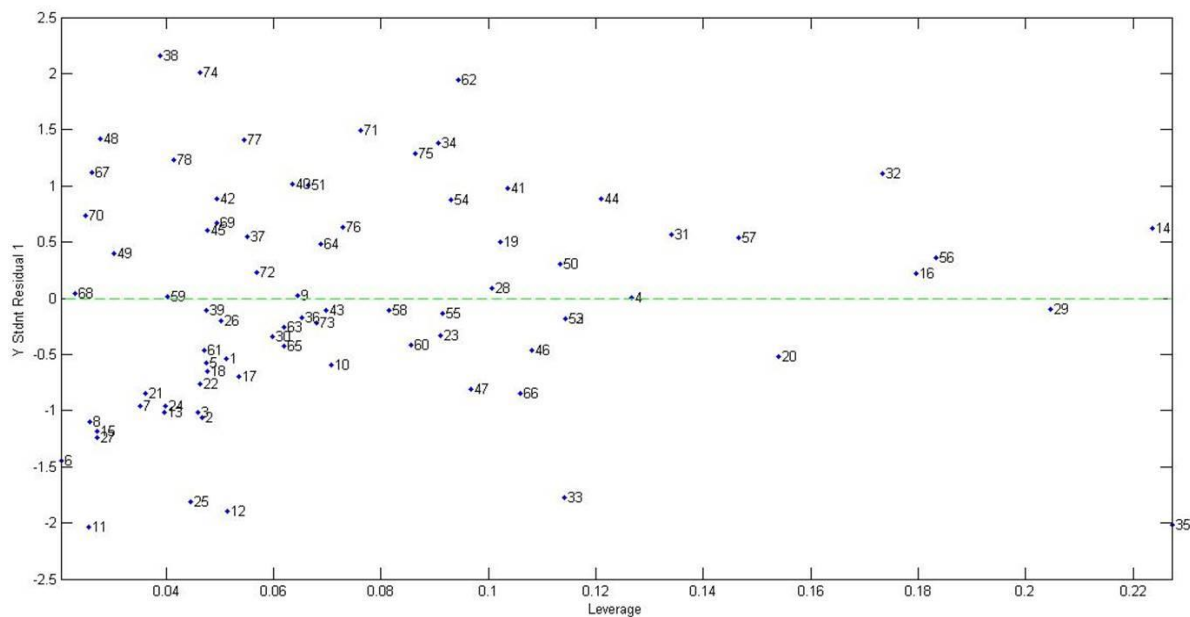
FIGURA 51 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADO PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE LV NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO NIR



FONTE: O Autor (2016).

Conforme o gráfico de *leverage versus* resíduos de *Students* (Figura 51), nenhuma amostra apresentou valores superiores de resíduos de *Students* (-2,5 ou 2,5) ou valores superiores de *leverage* ($L=0,23$). Dessa forma o modelo não apresentou anomalia em suas amostras de conjunto de calibração.

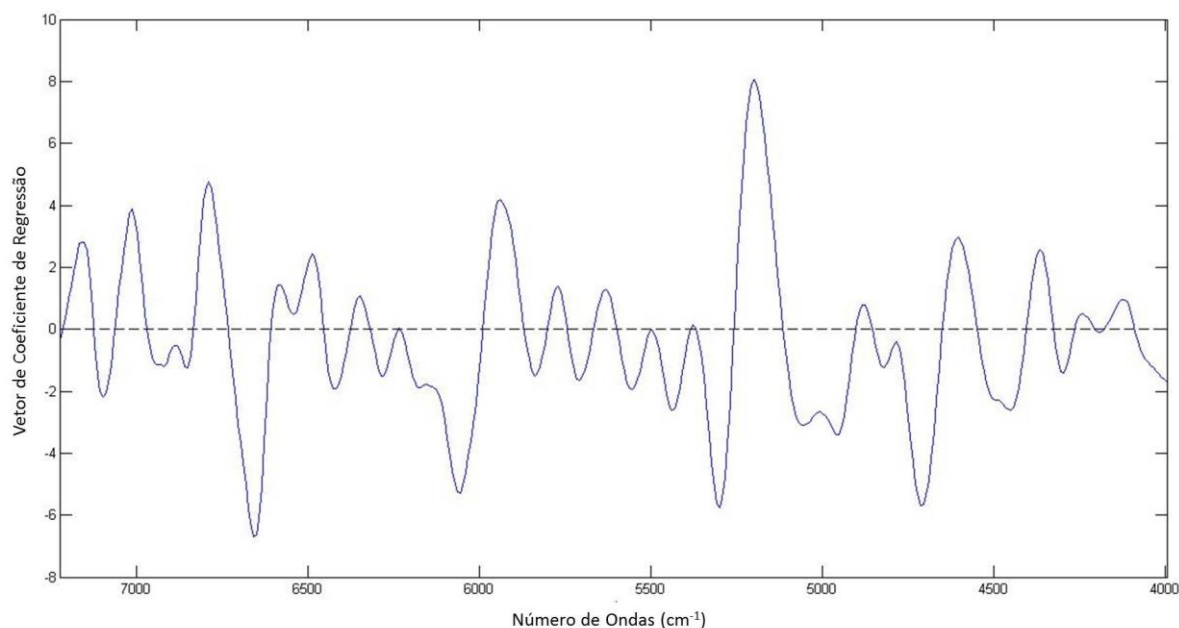
FIGURA 52 – GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE *STUDENTS* UTILIZADO PARA VERIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

O gráfico do vetor de coeficientes de regressão (Figura 52) demonstrou que os números de ondas mais significativos para a predição do modelo são os referentes às bandas de segundo sobretom de C=O e de primeiro sobretom de OH. Sendo condizentes com as bandas encontradas através de *loadings* durante a PCA utilizando os espectros de NIR.

FIGURA 53 – GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO MODELO PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO NIR



FONTE: O autor (2016).

Construído o modelo, o próximo passo foi à realização da validação externa. O conjunto de amostras de validação foi composto por: 9 amostras de *B. trimera* e 19 amostras das demais espécies de *Baccharis* (*B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. myriocephala*).

O resultado da validação externa (Tabela 4) demonstrou que o modelo na classificação para amostras de *B. trimera* foi eficiente, apresentando 100% de acertos nas predições. Demonstrando uma maior eficiência em relação ao modelo utilizando a região MIR. Portanto este modelo foi considerado adequado para a predição de amostras desconhecidas.

TABELA 4 – AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DO MODELO PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE *B. trimera* NA REGIÃO NIR

MODELO	AMOSTRAS DE <i>B. trimera</i> CLASSIFICADAS CORRETAMENTE	AMOSTRAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i> CLASSIFICADAS CORRETAMENTE
Modelo	100%	100%

FONTE: O AUTOR (2016).

5.4.3 MODELO DE CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA PARA AMOSTRAS DE *Baccharis articulata*, *Baccharis junciformis*, *Baccharis milleflora* E *Baccharis myriocephala*

Modelos para amostras de *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. myriocephala* também foram construídos, de modo a serem utilizados, assim como os modelos para amostras de *B. trimera*, para a predição das amostras comerciais.

Para todos os modelos foram testados diversos pré-processamentos, onde o melhor pré-processamento para cada modelo está listado na Tabela 5. Também estão presentes na tabela o número de LVs, e os resultados da validação externa para cada modelo.

Conforme os resultados da validação externa, os modelos utilizando a região do infravermelho próximo foram os mais eficientes, apresentando 100% de acerto nas predições durante a validação externa, exceto o modelo para amostras de *B. myriocephala*. O modelo em questão apresentou 100% de acertos para amostras de *B. myriocephala* e 96% de acertos para amostras de outras espécies de *Baccharis* (*B. trimera*, *B. articulata*, *B. junciformis* e *B. milleflora*) (Tabela 5).

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala*

(continua)

ESPÉCIE	PRÉ-TRATAMENTO	LV	REGIÃO DO INFRAVERMELHO	CLASSIFICAÇÃO CORRETA	
				AMOSTRAS DA ESPÉCIE EM QUESTÃO	AMOSTRAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i>
<i>B. articulata</i>	Autoescalamento e <i>Detrend</i>	4	MIR	100%	100%
	SNV e 1ª Derivada	6	NIR	100%	100%
<i>B. junciformis</i>	Dados centrados na média	7	MIR	100%	100%
	Dados centrados na média e <i>Detrend</i>	5	NIR	100%	100%
<i>B. milleflora</i>	Dados centrados na média e 1ª Derivada	7	MIR	100%	96%

TABELA 5 – AVALIAÇÃO DA VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS PARA A PREDIÇÃO DE AMOSTRAS DE *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora* E *B. myriocephala*

					(conclusão)
<i>B. milleflora</i>	Dados centrados na média e <i>Detrend</i>	7	NIR	100%	100%
<i>B. myriocephala</i>	Autoescalamamento e 1ª Derivada	6	MIR	75%	92%
	Dados centrados na média e <i>Detrend</i>	7	NIR	100%	96%

FONTE: O AUTOR (2016).

5.5 APLICAÇÃO DOS MODELOS POR PLS-DA EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Para a aplicação dos modelos por PLS-DA foram utilizadas 36 amostras comerciais das cidades de Curitiba – PR, Campo Largo – PR, Castro – PR, Mandirituba – PR, Bauru – SP e Belo Horizonte – MG.

Entre os modelos de classificação analisados anteriormente para as 5 espécies de *Baccharis*, os da região NIR foram os mais eficientes, dessa maneira estes foram aplicados às amostras comerciais.

Conforme as predições dos modelos, nenhuma das amostras comerciais foi classificada como *B. trimera*, conforme recomendada pela farmacopeia brasileira. Nessa classificação 27 amostras foram preditas corretamente, sendo 7 *B. articulata* e 20 *B. myriocephala* (Tabela 6).

TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COMERCIAIS PELOS MODELOS DE PLS-DA NA REGIÃO NIR CONSTRUÍDOS PARA AMOSTRAS DE *Baccharis*

							(continua)
Amostra	Origem	Classificação – Modelos por PLS-DA					
		TRI	ART	JUN	MIL	MYR	
BC 01	Curitiba (PR)	N	S	N	N	N	
BC 02	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S	
BC 03	Curitiba (PR)	N	S	N	N	S	
BC 04	Curitiba (PR)	N	N	N	S	N	
BC 05	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	N	
BC 06	Belo Horizonte (MG)	N	N	N	N	S	
BC 07	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	S	
BC 08	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	N	

TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COMERCIAIS PELOS MODELOS DE PLS-DA NA REGIÃO NIR CONSTRUÍDOS PARA AMOSTRAS DE *Baccharis*

(conclusão)

Amostra	Origem	Classificação – Modelos por PLS-DA				
		TRI	ART	JUN	MIL	MYR
BC 09	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	N
BC 10	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	S
BC 11	Belo Horizonte (MG)	N	S	S	N	S
BC 12	Curitiba (PR)	N	S	N	N	N
BC 13	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 14	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	S
BC 15	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	N
BC 16	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 17	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 18	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 19	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 20	Belo Horizonte (MG)	N	S	N	N	S
BC 21	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 22	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
BC 23	Mandirituba (PR)	N	N	N	N	S
CO 01	Castro (PR)	N	N	N	N	S
CO 02	Belo Horizonte (MG)	N	N	N	N	S
CO 03	Campo Largo (PR)	N	S	S	N	S
CO 05	Bauru (SP)	N	N	N	N	S
CO 06	Belo Horizonte (MG)	N	S	S	N	S
CO 07	Belo Horizonte (MG)	N	N	N	N	S
CO 08	Belo Horizonte (MG)	N	N	N	N	S
CO 09	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
CO 10	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
CO 11	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
CO 12	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S
CO 13	Curitiba (PR)	N	S	N	N	N
CO 14	Curitiba (PR)	N	N	N	N	S

FONTE: O autor (2016).

S - Classificada

N - Não classificada

TRI - Modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. trimera*ART - Modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. articulata*JUN - Modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. junciformis*MIL - Modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. milleflora*MYR - Modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. myriocephala*

As amostras BC03, BC07, BC10, BC11, BC14, BC20, CO03 e CO06, apresentaram classificações divergentes, em que traziam em seus rótulos apenas a identificação de carqueja, carqueja-amarga, carqueja-doce ou sem especificação (granel). Como demonstrado na Tabela 6, estas amostras foram classificadas em mais de uma espécie, sendo a maioria classificada em *B. articulata* e *B. myriocephala* simultaneamente. Essa classificação simultânea pode estar relacionada à mistura de espécies ao produto comercial, pois existem relatos na literatura de adição de amostras de *B. articulata* conhecida como “carqueja-doce” em produtos de *B. trimera* com o objetivo de diminuir o amargor para uma melhor aceitação pelo consumidor. (WATANABE, RAMBO, MARQUES, 2005; DRESH, 2006; BUDEL, 2009b).

As amostras que apresentaram essas divergências na classificação foram na maior parte amostras providas da cidade de Belo Horizonte. Dessa maneira a dificuldade na classificação pode ser devido a região da coleta dessas amostras. Nesse sentido, alguns fatores podem estar relacionados, como por exemplo, a regionalidade. Essa variável é bastante relevante, pois diversos fatores podem afetar o conteúdo metabólico da planta, como por exemplo, composição do solo, radiação ultravioleta, temperatura entre outros. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Ainda, pela dificuldade de identificação dessas espécies, as amostras podem conter misturas destas espécies.

6. CONCLUSÕES

A discriminação entre as espécies de *Baccharis* da seção *Caulopterae* estudadas foi obtida com êxito através da PCA das espécies separadamente e das espécies simultaneamente. Porém, as amostras de *B. trimera* e *B. myriocephala* apresentaram uma separação parcial, sendo obtida a melhor discriminação utilizando a região NIR.

A identificação das variáveis (números de ondas) responsáveis pela discriminação na região MIR e NIR na análise de *loadings*, demonstrou que os grupos responsáveis na separação foram: OH, OH de ácido carboxílico, anel aromático, C=O, e C-O. Conforme os dados da literatura foi possível inferir que os compostos envolvidos na discriminação foram da classe dos ácidos fenólicos e flavonoides, compostos estes já identificados na seção *Caulopterae*.

Os modelos construídos utilizando a PLS-DA na região MIR e NIR apresentaram uma boa eficiência na classificação das amostras das 5 espécies de *Baccharis* durante a validação externa. Destacando os modelos construídos na região NIR, que apresentaram acertos de 100% das predições, com exceção do modelo para as amostras de *B. myriocephala*, que apresentou uma (01) amostra com predição falso-positiva.

A aplicação dos modelos de classificação resultou em 75% das predições das amostras comerciais para *B. myriocephala* e *B. articulata*, espécies não recomendadas na farmacopeia brasileira. Vale salientar que os rótulos apresentavam em sua descrição, como carqueja, carqueja-amarga e carqueja-doce, denominação estas utilizadas para todas as espécies da seção. Os 25% restante apresentaram predições divergentes, provavelmente por possuírem alguma irregularidade, podendo estar relacionado à mistura entre as espécies da seção ou até mesmo regionalidade.

Desse modo o uso de espectroscopia por infravermelho aliado a quimiometria demonstrou uma ferramenta útil na discriminação e classificação de amostras pulverizadas de *Baccharis*. Considerando as vantagens da espectroscopia por infravermelho, como por exemplo, equipamentos acessíveis e robustos, análises simples, rápidas e não destrutivas, a mesma demonstra um atrativo para o controle de qualidade de *B. trimera*.

7. REFERÊNCIAS

- ABAD, M.J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v.7, p.76-96, 2007.
- ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). **Focus Article**, v. 2, p. 97-106, 2010.
- ALVES, L.F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5 n. 3, p. 450-513, 2013.
- ARAUJO, G. R.; RABELO, A. C. S.; MEIRA, J. S.; ROSSONI-JUNIOR, J. V.; BORGES, W. C.; GUERRA-SÁ, R.; BATISTA, M. A.; LEMOS, D. S.; SOUZA, G. H. B.; BRANDÃO, G. C.; CHAVES, M. M.; COSTA, D. C. *Baccharis trimera* inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47phox phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 0, p. 1-11, 2016.
- ARAZURI, S.; DIEZMA, B.; BLANCO, R.; GARCÍA-RAMOS, F.J. Comparison of different pre-treatments to improve accuracy of total soluble solids content prediction models in grapes using a portable NIR spectrophotometer. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 2, p. 218-223, 2014.
- ARGOTI, J. C.; LINARES-PALOMINO, P.J.; SALIDO, S.; RAMÍREZ, B.; INSUASTY, B.; ALTAREJOS, J. On-Line Activity Screening for Radical Scavengers from *Baccharis chilco*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 2, p. 189-197, 2013.
- ARMAROLI, T.; BÉCUE, T.; GAUTIER, S. Diffuse Reflection Infrared Spectroscopy (DRIFTS): Application to the in situ Analysis of Catalysts. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 215-237, 2004.
- BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, p. 3790-3798, 2013.
- BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, v. 30, n. 4, p. 51-58, 2005.
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira 5 ed.** ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- BRASIL. Diário Oficial da União. ANVISA. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso: 29/08/2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DAF/SCTIE/MS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS, Brasília – DF, fevereiro de 2009.

BRASIL. Diário Oficial da União. ANVISA. RDC nº 29, 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília – DF.

BESTEN.; APARECIDA, M.; NUNESA, D. S.; GRANATO, D.; SENS, S. L.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; SCHARFD, D. R. Chemical Composition of Essential Oils from Cladodes and Inflorescences from Male and Female Specimens of *Baccharis milleflora*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n.5, p. 899-905, 2014.

BLANCO, M.; VILLARROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, n. 4, p. 240-250, 2002.

BORDGNION, S. **Flora Digital. UFRGS**, 2015.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2003.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M.; FARAGO, P.V.; MATZENBACHER, N.I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15 n. 3, p. 268-271, 2005.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 75-85, 2009.

BUDEL, J. M. **Análise morfoanatômica de partes vegetativas aéreas de espécies de *Baccharis* L. (asteraceae) do Sul do Brasil**. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2009b.

Aplicação das técnicas espectroscópicas e quimiométricas no estudo do controle de qualidade das drogas vegetais: Embaúba, Malva e Ginseng Brasileiro. 123 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, 2010.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHEIN, S. Recent Applications of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Herbal Medicine Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 46, p. 251-260, 2011.

BYLESJO, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 341-351, 2006.

CAMPOS, F. R.; BRESSAN, J.; JASINSKI, V. C. G.; ZUCCOLOTTO, T.; da SILVA, L. E.; CERQUEIRA, L. B. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. **Chemical Biodiversity**, v. 13 p. 1 -17, 2016.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHEN, X.; WU, D.; HE, Y.; LIU, S. Nondestructive Differentiation of *Panax* Species Using Visible and Shortwave Near-Infrared Spectroscopy. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 753-761, 2011.

CONDE, B. E.; MACEDO, A. L.; MARTINS, A. E.; FONSECA, A. S.; SIQUEIRA, A. M.; SOUZA, G. H. L.; ROGÉRIO, I. T. S. Estudo crítico sobre utilização de fitoterápicos por praticantes de exercício físico em academias de musculação. **Perspectiva online**, v. 16, n.5, p. 33-47, 2015.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

CORREA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba, EMATER-PR, 1991, 151p.

DRESCH, A. P.; MONTANHA, J. A.; MATZENBACHER, N. I.; MENTZ, L. A. Controle de qualidade de espécies do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae) por CCD a partir de extratos rápidos. **Infarma**, Brasília, v. 18, n. 11/12, p. 37-39, 2006.

ENGEL, J.; GERRETZEN, J.; SZYMANSKA, E.; JANSEN, J.; DOWNEY, G.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. C. Breaking with trends in pre-processing? **Trends in Analytical chemistry**, v. 50, p. 96-106, 2013.

ERIKSSON, L.; ANDERSSON, P. L.; JOHANSSON, E.; TYSKLIND, M. Megavariate analysis of environmental QSAR data. Part I—A basic framework founded on principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS), and statistical molecular design (SMD). **Molecular Diversity**, v. 10, p. 169-186, 2006.

FENG, L.; SHU, L.; JIAN, L.; GUILIANG, C.; YAN, C.; YUNPENG, Q.; YIFENG, C.; YUTIAN, W. A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, 2007.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724 -731, 1999.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações. 1 Ed. Unicamp. Campinas, 2015.

FREITAS, L. V.; FREITAS, A. P. B. R.; VERASZTO, E. V.; MARINS, F. A. S.; SILVA, M. B. Partial Least Squares for Predicting the Physicochemical Properties in Petroleum Products. **European International Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 9, p. 87-92, 2013.

FU, H.; HUANG, D.; YANG, T.; SHE, Y.; ZHANG, H. Rapid recognition of Chinese herbal pieces of *Areca catechu* by different concocted processes using Fourier transform mid-infrared and near-infrared spectroscopy combined with partial least-squares discriminant analysis. *Chinese Chemical Letters*, v. 24, p. 639-642, 2013.

GAD, H. A.; EL-AHMADY, S. H.; ABOU-SHOER, M. I.; AL-AZIZI, M. M. Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 1-24, 2012.

GARCIA, F. A. O.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LAPA, A. J.; LANDMAN, M. T. R. L.; SOUCCAR, C. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1021-1025, 2014.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GHASEMI, J. B.; ROFOUCI, M. K.; AMIRI, N.; MAGHSOUDI, A.; ZOLFONOUN, E. A chemometric study on the stream sediments of Meshkinshahr, NW Iran, using supervised and unsupervised classification methods. **Arab Journal of Geosciences**, v. 8, p. 2853-2861, 2015.

GIULIANO, D. A. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana**, v. 30, n. 1-2 p. 131-154, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, N. S. S.; MELLO J. C.; PAIVA J. S.; BUENO, P. C.P.; BERRETTA, A. A.; TORQUATO, R. J.; NANTES, I. L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 1091-1097, 2012.

HEIDEN, G. **O gênero *Baccharis* L. seção *Caulopterae* DC. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul**. Pelotas, 238 p. Monografia (Monografia em Botânica)-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2005

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; STEIN, V.; BOBROWSKI, V. L. Número cromossômico de *Baccharis riograndensis* malag. & j. e. vidal (Asteraceae). **Pesquisa, Botânica**, n. 57, p. 121-136, 2006.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 943-983, 2009.

HEIDEN, G.; BAUMGRATZ, J. F. A.; ESTEVES, R. L. *Baccharis* subgen. Molina (Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, p. 649-687, 2012.

HEIDEN, G., SCHNEIDER, A.A., 2013. *Baccharis*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5151>> . acesso: 10/08/2015.

HUBERT, M.; BRANDEN, K. V. Robust methods for partial least squares regression. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 537-549, 2003.

JING, D.; DEGUANG, W.; LINFANG, H.; SHILIN, C.; MINJIAN, Q. Application of chemometrics in quality evaluation of medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 4001 – 4008, 2011.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.2, p. 280-286, 2013.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, S. G.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186-199, 2014.

LEÃO, K. V. **Aplicação das técnicas espectroscópicas e quimiométricas no estudo do controle de qualidade das drogas vegetais: Embaúba, Malva e Ginseng Brasileiro**. 123 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, 2010.

LI, W.; CHENG, Z.; WANG, Y.; QU, H. Quality control of *Lonicerae Japonicae* Flos using near infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, n. 18, p. 33-39, 2013.

LI, B.; WANG, C.; XI, L.; WEI, Y.; DUANA, H.; WU, X. Qualitative and quantitative analysis of *Angelica sinensis* using near infrared spectroscopy and chemometrics. **Analytical Methods**, v. 6, p. 9691-9697, 2014.

LI, C.; YANG, S.; GUO, Q.; ZHENG, K.; WANG, P.; MENG, Z. Geographical traceability of *Marsdenia tenacissima* by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 152, p. 391-396, 2016.

LÚCIO-GUTIERREZ, J. R.; COELLO, J.; MASPOCH, S. Expeditious identification and semi-quantification of *Panax ginseng* using near infrared spectral fingerprints and multivariate analysis. **Analytical Methods**, v. 5, p. 857-865, 2013.

LUYPAERT, J.; HEUERDING, S.; HEYDEN, Y. V.; MASSART, D. L. The effect of preprocessing methods in reducing interfering variability from near-infrared measurements of creams. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 495-503, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Ed. 1. 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd03_18.pdf>. Acesso em 15/05/2015.

MULLER, J. **Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus.** 341 f. Monografia - Universidade de Michigan, Michigan, 2006.

MULLER, J. **World checklist of *Baccharis* L.**, 2013. Disponível em: < www.spezb.uni-jena.de/wp-content > Acesso em 22/02/2017.

MUNSON, C. A.; LUCIA, F. C.; PIEHLER, T.; MCNESBY, K. L.; MIZIOLEK, A. W. Investigation of statistics strategies for improving the discriminating power of laser-induced breakdown spectroscopy for chemical and biological warfare agents simulants. **Spectrochimica Acta part B**, v. 60, p. 1217-1224, 2005.

OLIVEIRA, S. Q.; PIZZOL, F. D.; GOSMANN, D.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P. Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. **Free Radical Research**, v. 37, n. 5, p. 555-559, 2003.

OLIVEIRA, A.S.; DEBLE, L.P.; SCHNEIDER, A.A. & MARCHIORI, J.N.C. Checklist do gênero *Baccharis* L. para o Brasil (Asteraceae Astereae). **Balduinia**, v.9, p.17-27, 2006.

OLIVEIRA, G. A.; BUREAU, S.; RENARD, C. M. G. C.; NETTO, A. B. P.; CASTILHOS, F. Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. **Food Chemistry**, v. 143, p. 223-230, 2014.

PANIS, C. Plantas do gênero *Baccharis* em fitoterapia. Uso popular x comprovação científica. **Infarma**, v. 20 n. 6, p. 30-34, 2008.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PERON, A. P; FELIPES, J.; MATTGE, G. I.; CANTAGALLI, L. B; MARIUCCI, R. G.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

PRADO, P. I.; LEWINSOHN, T. M., CARMO, R. L.; HOGAN, D. J. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciência ambientais. **Ambiente & Sociedade**, n. 10, p. 1-17, 2002.

RERIS, R.; BROOKS, J. P. Principal Component Analysis and Optimization: A Tutorial. **INFORMS Computing Society Conferenc**, v. 11, p. 212-225, 2015.

RINNAN, A.; BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

ROBOTTI, E.; MARENGO, E. Chemometric Multivariate Tools for Candidate Biomarker Identification: LDA, PLS-DA, SIMCA, Ranking-PCA. **Molecular Biology**, v. 1384, p. 237-267, 2016.

ROHAETI, E.; RAFI, M.; SYAFITRI, U. D.; HERYANTO, R. Fourier transform infrared spectroscopy combined with chemometrics for discrimination of *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber cassumunar*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 1244-1249, 2015.

ROHMAN, A.; NUGROHO, A.; LUKITANINGSIH, E.; SUDJADI. Application of Vibration Spectroscopy in Combination with Chemometrics Techniques for Authentication of Herbal Medicine. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 49, p. 603-613, 2014.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; MARTINEZ, C. L.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683-700, 2007.

ROLIM, R. G. **Flora Digital. UFRGS**, 2011.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

SCHNEIDER, A. A. **Estudo Taxonomico de *Baccharis* L. Sect. *Caulopterae* DC. (Asteraceae:Asteraceae) no Brasil**. 197 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

SHIN, E. C.; CRAFT, B. D.; PEGG, R. B.; PHILLIPS, R. D.; EITENMILLER, R. R. Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). **Food Chemistry**, v. 119, p. 1262-1270, 2010.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and On-line Identification of Antioxidant Compounds from Three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with Post-column Derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005.

SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8 Ed. Thomson, São Paulo, 2009, 999p.

SUN, S.; CHEN, J.; ZHOU, Q.; LU, G.; CHAN, K. Application of mid-infrared spectroscopy in the quality control of traditional Chinese medicines. **Planta Medica**, v. 76, n. 17, p. 1987-1996, 2010.

Tropicos. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/> > Acesso em: 19/08/2015.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

XAVIER, V.B.; VARGAS, R.M.F.; CASSEL, E.; LUCAS, A.M.; SANTOS, M.A.; MONDIN, C.A.; SANTAREM, E.R.; ASTARITA, L.V.; SARTOR, T. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n.3, p. 599–604, 2011.

WATANABE, T. M.; RAMBO, M. F.; MARQUES, L.C. Caracterização farmacognóstica de espécies de *Baccharis* comercializadas como carqueja. **Revista Racine**, São Paulo, v. 15, p. 90-95, 2005.

ZENG, Z.; CHAU, F.; CHAN, H.; CHEUNG, C.; LAU, T.; WEI, S.; MOK, D. L. K.; CHAN, C.; LIANG, YIZENG. Recent advances in the compound-oriented and pattern-oriented approaches to the quality control of herbal medicines. **Chinese Medicine**, v. 9, n. 3, p. 1-7, 2008.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

YANG, C.; LI, W.; WEIWEI, W.; WU, S.; LU, W. A Review: Detecting Alterations of Brain Connectivity in Schizophrenia based on Structural MRI. **Journal of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 1-5, 2014.

YAP, K. Y.; CHAN, S. Y.; LIM, C. S. Infrared-based protocol for the identification and categorization of ginseng and its products. **Food research international**, v. 40, n. 5, p. 643-652, 2006.

WEI, A. Y.; FANAB, W.; ZHAOC, X.; WUC, W.; LUA, H. Rapid Authentication of *Dendrobium officinale* by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy and Chemometrics. **Analytical Letters**, v. 48, p. 817-829, 2015.

WHO - World Health Organization - The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. 12p, 2011.